

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002457

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: 04090284.3  
Filing date: 21 July 2004 (21.07.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 April 2005 (13.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

11.03.05

**Europäisches  
Patentamt****European  
Patent Office****Office européen  
des brevets****Bescheinigung****Certificate****Attestation**

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

**Patentanmeldung Nr.    Patent application No.    Demande de brevet n°**

04090284.3

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

**R C van Dijk**





Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

PCT/EP200 5 / 0 0 2 4 5 7

11.03.05

Anmeldung Nr:  
Application no.: 04090284.3  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 21.07.04  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt/Main  
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender Enzyme

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

C12N15/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL  
PL PT RO SE SI SK TR LI





Bayer CropScience GmbH

## **Pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer Stärke phosphorylierender**

### **5 Enzyme**

#### **Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins und eines Stärke phosphorylierenden R1  
10 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und  
15 Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, Nucleinsäuremoleküle und Vektoren, enthaltend Sequenzen, die für ein OK1 Protein und ein R1 Protein codieren, sowie  
20 Wirtszellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen  
25 Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den  
30 Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren

physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im Wesentlichen unverzweigten Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch  
5 das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von  $5 \times 10^5 - 10^6$  Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und  
10 ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde  
15 jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizuka und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das  
20 Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngröße von Stärken werden u.a. durch das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den  
25 Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße die Stärkekornmorphologie etc. beeinflusst. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die Glucosemoleküle der Stärke gebundenen ist (im Folgenden als Stärkephosphat  
30 bezeichnet) und Phosphat in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden.

- Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B. bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an
- 5 Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen- oder Wurzelspeichestärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%),
- 10 Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.
- 15 Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2, C-3 oder C-6 Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971, Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Phosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der Phosphatreste in
- 20 C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind (Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et al. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6 Position der Glukosemoleküle gebunden ist, für verschiedene Stärken, wie z.B. Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke
- 25 aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol pro mg Stärke), Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat
- 30 nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zurzeit nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase (GWD, E.C.: 2.7.9.4) (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet und ist an die Stärkekörner der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477). In der von R1 katalysierten Reaktion werden die Edukte alpha-1,4-Glucan (Stärke), Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser zu den Produkten Glucan-Phosphat (Stärkephosphat), Monophosphat und Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen. R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6- und die C-3-Position der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der Stärke gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.ä. durch Verwendung von Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-Glucane einführen.

25

Weizenpflanzen, welche durch Überexpression eines R1 Gens aus Kartoffel eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind in WO 02 34923 beschrieben. Diese Pflanzen synthetisieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, in welchen kein Stärkephosphat detektiert werden konnte, eine Stärke mit signifikanten Mengen an Stärkephosphat in der C-6-Position der Glucosemoleküle.

30

Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch

Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen von der Erhöhung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu erhöhen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, modifizierte Stärken mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie Pflanzenzellen und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren, als auch Verfahren und Mittel zur Erzeugung besagter Pflanzen und/oder Pflanzenzellen zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und mindestens eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Pflanzenzelle oder eine Pflanze, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und gleichzeitig mindestens eines R1 Proteins führt, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und (gleichzeitig) mindestens eines R1 Proteins in genetisch modifizierten Pflanzenzellen oder genetisch modifizierten Pflanzen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die OK1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an OK1 Protein in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von OK1 Proteinen in den Zellen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines R1 Proteins" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die R1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an R1 Protein in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von R1 Proteinen in den Zellen.

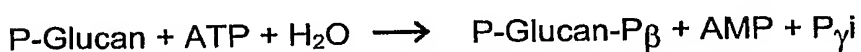
Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an Transkripten, die OK1 Proteine oder R1 Proteine codieren. Dieses kann z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR erfolgen. Eine Erhöhung  
5 bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein OK1 Protein, bedeutet auch, dass Pflanzen oder  
10 Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein aufweisen. Eine Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein R1 Protein, bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten,  
15 codierend ein R1 Protein, aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein R1 Protein, aufweisen.

Die Erhöhung der Menge an Protein eines OK1 Proteins oder eines R1 Proteins, die  
20 eine erhöhte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten  
25 Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an OK1 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines OK1 Proteins aufweisen.  
30 Eine Erhöhung der Menge an R1 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines R1 Proteins aufweisen.



Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit einem OK1 Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 10). Ein Antikörper, mit welchem eine Erhöhung der Menge an R1 Protein mittels immunologischer Methoden festgestellt werden kann, ist bei Lorberth et al. (1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) und Ritte et al. (2000, Plant Journal 21, 387-391) beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „OK 1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf bereits phosphorylierte Stärke (P-Stärke) überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an kovalent gebundenen Phosphatresten auf und werden von einem OK1 Protein nicht phosphoryliert, d.h. ein erfindungsgemäßes OK1 Protein benötigt bereits phosphorylierte Stärke als Substrat zur Übertragung weiterer Phosphatreste. Bevorzugt wird von einem OK1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht bei einer durch ein OK1 Protein durchgeführten Phosphorylierungsreaktion von P-Stärke AMP (Adenosinmonophosphat). Ein OK1 Protein wird daher als [phosphoryliertes-alpha-Glucan]-Wasser-Dikinase ([P-Glucan]-Wasser-Dikinase) bzw. als [phosphorylierte-Stärke]-Wasser-Dikinase bezeichnet. OK1 Proteine katalysieren daher eine Reaktion nach dem folgenden Schema:



Bevorzugt entsteht an der durch ein OK1 Protein phosphorylierten P-Stärke eine zusätzliche Phosphatmonoesterbindung in C-6-Position und/oder in C-3-Position

eines Glucosemoleküls der P-Stärke. Besonders bevorzugt entstehen bei der durch ein OK1 Protein katalysierten Phosphorylierung von P-Stärke mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle der betreffenden P-Stärke.

Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von OK1 Proteine codierenden Aminosäuresequenzen zwei Histidine.

Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer P-Stärke durch ein OK1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes OK1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden ist. Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des OK1 Proteins, d.h. das OK1 Protein selbst katalysiert die Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt führt. Bevorzugt wird durch die Autophosphorylierung ein Histidinrest der Aminosäuresequenz, codierend ein OK1 Protein, phosphoryliert, besonders bevorzugt ein Histidinrest, der Bestandteil einer Phosphohistidindomäne ist.

Weiterhin weisen erfindungsgemäße OK1 Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität zu P-Stärke auf im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke.

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die P-Stärke als Substrat benötigen, um diese weiter zu phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Dieses ist nun durch Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich. Die Aufklärung der Funktion eines OK1 Proteins und damit die Bereitstellung eines OK1 Proteins führt dazu, dass nun Pflanzen dahingehend genetisch modifiziert werden können, dass sie eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren. Das Verändern der Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Proteine und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung

des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich. Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass bei einem gleichzeitigen Zusammenwirken eines OK1 Proteins mit einem R1 Protein höhere Mengen an Phosphat in die Stärke eingebaut werden, als wenn die jeweiligen Proteine räumlich oder zeitlich getrennt voneinander Stärke bzw. P-Stärke phosphorylieren. Damit ist es möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „R1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf Stärke überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an kovalent gebundenen Phosphatresten auf werden jedoch von einem R1 Protein phosphoryliert. D.h. nicht-phosphorylierte-Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante wird in einer durch ein R1 Protein katalysierten Phosphorylierungsreaktion als Substrat verwendet.

Bevorzugt wird von einem R1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht AMP (Adenosinmonophosphat). Ein R1 Protein wird daher als [alpha-1,4-Glucan]-Wasser-Dikinase bzw. als Stärke- Wasser-Dikinase bezeichnet (E.C.: 2.7.9.4; Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Bei der durch ein R1 Protein katalysierten Phosphorylierung von Stärke entstehen mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position der Glucosemoleküle der betreffenden Stärke. Von einem R1 Protein werden ca. 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position und ca. 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke eingeführt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171).

Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer Stärke durch ein R1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes R1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des R1 Proteins gebunden ist (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des R1 Proteins, d.h. das R1 Protein selbst katalysiert die Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt führt. Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen

sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von R1 Proteine codierenden Aminosäuresequenzen ein Histidin. Durch die Autophosphorylierung eines R1 Proteins wird ein Histidinrest in einer Phosphohistidindomäne der Aminosäuresequenz, codierend ein R1 Protein, phosphoryliert (Mikkelsen et al., 2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999).

Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US 6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444, GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben. Die genannten Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen codierend R1 Proteine sind u.a. veröffentlicht vom NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) und sind durch Nennung der Referenzen ausdrücklich in die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung aufgenommen.

Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat verstanden werden. D.h., dass die Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle von Stärke gebundene Phosphatgruppen verstanden werden.

Unter dem Begriff „nicht-phosphorylierte-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche keine nachweisbaren Mengen an Stärkephosphat enthält. Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat

sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185) beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane  
5 (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

Unter dem Begriff „phosphorylierte-Stärke“ oder „P-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche Stärkephosphat enthält.

10

Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines OK1 Proteins z.B. durch *in vitro* Inkubation eines OK1 Proteins unter Verwendung von ATP, welches einen in der beta-Position markierten Phosphatrest enthält (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei  
15 welchem nur der Phosphatrest in beta-Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  markiert ist, verwendet. Wird ein OK1 Protein mit markiertem ATP und Stärken, welche nicht  
20 phosphoryliert sind, inkubiert, wird kein Phosphat durch OK1 auf die Stärke übertragen. Bevorzugt wird Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

Wird ein OK1 Protein hingegen mit P-Stärke in Gegenwart von markiertem ATP inkubiert, so kann anschließend kovalent an die P-Stärke gebundenes markiertes  
25 Phosphat nachgewiesen werden. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch phosphorylierte Stärke aus *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) verwendet.

Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein OK1 Protein  
30 in P-Stärke eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung der markierten P-Stärke (z.B. durch Ausfällen mittels Ethanol, Filtration, chromatographische Methoden etc.) vom Rest des Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten Phosphatreste in der P-Stärke Fraktion. Die in der P-Stärke Fraktion gebundenen

markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-Stärke Fraktion vorliegenden Radioaktivität (z.B. mittels Szintillationszähler) nachgewiesen werden. Mögliche Methoden zum Nachweis eines Proteins, welches P-Stärke als Substrat für eine Phosphorylierungsreaktion benötigt, ist weiter unten  
5 unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 und in Beispiel 6 beschrieben.

Die Aktivität eines R1 Proteins kann z.B. nachgewiesen werden wie in der Literatur beschrieben (Mikkelsen et al., 2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999; Ritte et al., 2002, PNAS 99,  
10 7166-7171).

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in P-Stärke von einem OK1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein phosphorylierten P-Stärken wie bei Ritte et al.  
15 (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte P-Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder  
20 C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

25

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in Stärke von einem R1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein R1 Protein phosphorylierten Stärken wie bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein  
30 phosphorylierte Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke oder die von einem R1 Protein phosphorylierte Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke bzw. der Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte  
5 Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein oder R1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

- 10 Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt bei der durch ein OK1 Protein vermittelten Phosphorylierung von P-Stärke entsteht, kann wie z.B. bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) oder Mikkelsen et al. (2003, Biochemical Journal Intermediate Publication. Published on October 2003 as manuscript BJ20030999) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden

15

Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein OK1 Protein zunächst in Abwesenheit von Stärke mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit  $^{33}\text{P}$  in beta-Phosphat-Position markiertem ATP inkubiert. Parallel dazu  
20 wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt  
25 und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und weiter inkubiert, bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-Stärke hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren  
30 des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert,

bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der jeweiligen Reaktionsgemische vorliegende Stärke wird vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen Stärke z.B. durch Zentrifugation statt, so befindet sich die Stärke des jeweiligen Teils A bzw.

5 jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese,

10 gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden. Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann bekannte Methode des so genannten „Phosphoimaging“ verwendet werden. Zeigt die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im

15 Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im

20 Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich kann die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebene Stärke des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach

25 anschließendem Waschen der jeweiligen Stärken, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die Stärken des Teils A des Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatrete und zeigt, die Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant

30 erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucose,



kein signifikant erhöhtes Signal für mit  $^{33}\text{P}$  markierte alpha-1,4-Glucane aufweisen. Möglichkeiten zum Nachweis eines phosphorylierten OK1 Protein Zwischenproduktes sind weiter unten unter Allgemeine Methoden Punkt 12 und in Beispiel 7 beschrieben.

5

Dass ein OK1 Protein eine erhöhte Bindungsaktivität zu einer P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist, kann durch Inkubation des OK1 Proteins mit P-Stärke und nicht-phosphorylierter-Stärke in jeweils getrennten Ansätzen erfolgen.

10 Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit nicht-phosphorylierter-Stärke sind grundsätzlich alle nicht-phosphorylierten-Stärken geeignet. Bevorzugt wird eine nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke einer *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* verwendet.

15 Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden Punkt 2) beschriebene Methode zur Isolierung von nicht-phosphorylierter-Stärke verwendet.

20

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit P-Stärke sind grundsätzlich alle Stärken geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit OK1 Proteinen P-Stärken eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer *sex-1* Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

25

30 Zum Nachweis einer erhöhten Bindungsaktivität von OK1 Proteinen zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke werden OK1 Proteine in voneinander getrennten Ansätzen mit P-Stärke (Ansatz A) und mit nicht-phosphorylierter-Stärke (Ansatz (B)) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die nicht an die betreffenden Stärken der Ansätze A und B gebundenen Proteine von den Stärken und den an sie

gebundenen Proteinen abgetrennt. Die Bindung zwischen den Proteinen und der P-Stärke im Ansatz A und die Bindung zwischen den Proteinen und nicht-phosphorylierter-Stärke im Ansatz B wird anschließend aufgehoben, d.h. die betreffenden Proteine werden in Lösung gebracht. Die in Lösung gebrachten

5 Proteine des Ansatzes A und des Ansatzes B können dann von den betreffenden Stärken, die in den entsprechenden Ansätzen vorliegen, abgetrennt werden. Daraufhin kann eine Auftrennung der isolierten P-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes A bzw. der isolierten nicht-phosphorylierte-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes B, mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration,

10 chromatographische Verfahren, Elektrophorese, SDS-Acrylamidgelelektrophorese etc. erfolgen. Durch Vergleich der Mengen aufgetrennter Proteine des Ansatzes A mit den Mengen korrespondierender aufgetrennter Proteine des Ansatzes B, kann ermittelt werden, ob ein Protein eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-Stärke aufweisen. Methoden, mit welchen

15 eine bevorzugte Bindung von Proteinen an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke nachgewiesen werden kann, sind weiter unten in Beispiel 8 beschrieben.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus

20 *Arabidopsis thaliana* und die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK 1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen Aminosäuresequenzen codierend ein OK1 Proteine eine Identität mit der in SEQ ID

25 NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Sequenz eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% auf.

30 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das OK1 Protein eine Phosphohistidindomäne auf. Aminosäuresequenzen, codierend OK1 Proteine, enthalten eine Phosphohistidindomäne, die zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus *Arabidopsis*

*thaliana* eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweist.

- 5 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.
- 10 In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes Einführen dieser Moleküle zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und zur Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins führt.
- 15 Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression eines fremden Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“ Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder
- 20 mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression eingeführter Nucleinsäuremoleküle eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eine Erhöhung der Aktivität eines R1 Proteins.
- 25 Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt
- 30 oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren

Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

Prinzipiell kann ein fremdes Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der  
5 Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins bewirkt.

Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere  
10 Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert, bevorzugt ein OK1 Protein  
15 aus *Arabidopsis thaliana* oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz.  
20

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert, bevorzugt ein R1 Protein aus Kartoffel oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.  
25

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel mit der in GenBank Acc.: Y09533 (22-JUL-2003 Rel. 76, Last updated, Version 2) angegebenen Aminosäuresequenz. Die Nucleinsäuremoleküle und Aminosäuresequenzen codierend ein R1 Protein aus Kartoffel (GenBank Acc.:  
30 Y09533) ist durch Nennung der Referenzen ausdrücklich in die Beschreibung der vorliegenden Anmeldung aufgenommen.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass ein erstes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert und ein zweites fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.

5

Bei den zur genetischen Modifikation in die Pflanzenzelle oder Pflanze eingebrachten fremden Nucleinsäuremolekülen kann es sich um ein einzelnes Nucleinsäuremolekül oder um mehrere Nucleinsäuremoleküle handeln. Es kann sich daher sowohl um Nucleinsäuremoleküle handeln, die OK 1 Proteine codierende Nucleinsäuresequenzen und R1 Proteine codierende Nucleinsäuresequenzen enthalten, als auch um Nucleinsäuremoleküle bei denen die OK 1 Proteine codierenden Nucleinsäuresequenzen und die R1 Proteine codierenden Nucleinsäuresequenzen auf verschiedenen Nucleinsäuremolekülen vorliegen. Die ein OK1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen und die ein R1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen können beispielsweise in einem Vektor, Plasmid oder linearen Nucleinsäuremolekül gleichzeitig enthalten sein, oder aber Bestandteile von zwei jeweils voneinander getrennten Vektoren, Plasmiden oder linearen Nucleinsäuremolekülen sein.

Liegen die ein OK1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen und die ein R1 Protein codierenden Nucleinsäuresequenzen in zwei voneinander getrennten Nucleinsäuremolekülen vor, so können sie entweder zeitgleich („Cotransformation“) oder auch nacheinander, d.h. zeitlich aufeinander folgend („Supertransformation“) in das Genom der Pflanzenzelle oder Pflanze eingeführt werden. Die voneinander getrennten Nucleinsäuremoleküle können auch in verschiedene individuelle Pflanzenzellen oder Pflanzen einer Spezies eingeführt werden. Es können dadurch Pflanzenzellen oder Pflanzen erzeugt werden, bei welchen die Aktivität von entweder mindestens einem OK1 Protein oder aber mindestens einem R1 Protein erhöht ist. Solche Pflanzen können dann durch anschließendes Kreuzen der Pflanzen, bei welchen die Aktivität eines OK1 Proteins erhöht ist, mit solchen, bei welchen die Aktivität eines R1 Proteins erhöht ist, hergestellt werden.

Weiterhin können zur Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle bzw. Wildtyp-Pflanze, eine Mutantenzelle bzw. eine Mutante,

die sich dadurch auszeichnet, dass sie bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins oder eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, verwendet werden. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um spontan (natürlich) auftretende Mutanten, als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von Mutagenen (wie  
5 z.B. chemische Agentien, ionisierende Strahlung) oder gentechnischen Verfahren (z.B. T-DNA-activation-tagging, Transposon-activation tagging, *in situ* activation, *in vivo*- Mutagenese) erzeugt wurden.

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können daher auch durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches zur Erhöhung  
10 der Aktivität eines R1 Proteins führt, in eine Mutantenzelle oder eine Mutante, die bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, hergestellt werden. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können auch durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins führt, in eine Mutantenzelle oder eine Mutante, die  
15 bereits eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, hergestellt werden.

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen können auch erzeugt werden, indem eine Mutante, bei welcher die Aktivität eines OK1 Proteins erhöht ist, mit einer Pflanze, die aufgrund der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, kreuzt.  
20 Ebenso ist es möglich, erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen zu erzeugen, indem man eine Mutante, bei welcher die Aktivität eines R1 Proteins erhöht ist, mit einer Pflanze, die aufgrund der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, kreuzt.

25 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des  
30 biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblaserdam (1985), Chapter V;

Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

- 5 Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf *Agrobacterium* Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci.
- 10 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die
- 15 Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology
- 20 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).
- Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307). Alle vorstehenden Methoden sind im
- 25 Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

- Pflanzenzellen und Pflanzen, die durch Einführung eines OK1 Proteins und/oder eines R1 Proteins genetisch modifiziert sind, lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes
- 30 Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen

bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden  
5 Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise  
10 in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden, dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht  
15 vorkommt (vorkommen). Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist ein  
20 eingeführtes fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Erfindungsgemäße  
25 Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die ein Antisense- und/oder ein RNAi-Transkript exprimieren, können z.B. mit Hilfe von spezifischen Nucleinsäure-Sonden, die komplementär zur der für das Protein codierenden (natürlich in der Pflanzenzelle vorkommenden) RNA sind, nachgewiesen werden. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen  
30 Pflanzen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.



Ist ein eingeführtes fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

- 10 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül codierend ein OK1 Protein ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- 20 b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- 25 d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der codierenden Region der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der codierenden Region der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- 30 e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;

- g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringen-  
5 Bedingungen hybridisieren;
- i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- 10 j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

Die in SEQ ID NO 1 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ  
15 ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* umfasst.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde am 03.03.2004 unter der Nummer DSM16264  
20 und das Plasmid pMI50, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* codiert, wurde am 19.03.2004 unter der Nummer DSM16302 nach dem Budapester Vertrag hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden  
25 Region der in Plasmid A.t.-OK1-pGEM integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid pMI50 integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch  
30 Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder die von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird, wobei das codierte Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von

mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der Aminosäuresequenz, die von der Insertion in A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 abgeleitet werden kann, aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein  
5 codieren und die codierende Region der unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleotidsequenzen oder zu diesen komplementäre Sequenzen umfassen, Nucleinsäuremoleküle, die die codierende Region der Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen und Nucleinsäuremoleküle, die zu den genannten Nucleinsäuremolekülen eine  
10 Identität von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweisen.

Mit Hilfe der Sequenzinformation erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle bzw. mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist es dem Fachmann nun möglich, homologe Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, vorzugsweise aus  
15 Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere *Oryza sativa* oder aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Dies kann beispielsweise mit Hilfe konventioneller Methoden, wie dem Durchmustern von cDNA oder genomischen Banken mit geeigneten Hybridisierungsproben erfolgen. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Isolierung homologer Sequenzen auch mit Hilfe von  
20 (degenerierten) Oligonucleotiden und der Verwendung von PCR basierten Methoden erfolgen kann.

Auch die Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, kann zur  
25 Identifizierung von homologen Sequenzen, die für OK1 Protein codieren, dienen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast- oder fasta  
30 searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die

Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind diese folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11,  
5 Extension = 1.

Für Nucleinsäuresequenzvergleich (blastn) sind folgende Parameter einzustellen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 11.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung  
10 beschriebenen Sequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um weitere Nucleinsäuremoleküle und/oder Proteine zu identifizieren, die ein OK1 Protein codieren.

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren und/oder zu isolieren, die mit der unter SEQ  
15 ID NO 1 oder unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz hybridisieren und die ein OK1 Protein codieren.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrock et al., Molecular  
20 Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind. Besonders bevorzugt bedeutet "Hybridisierung" eine Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen:

Hybridisierungspuffer:

2xSSC; 10xDenhardt-Lösung (Fikoll 400+PEG+BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5  
25 mM EDTA; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 µg/ml Heringssperma DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS

Hybridisierungstemperatur:

T=65 bis 68°C

Waschpuffer: 0,1xSSC; 0,1% SDS

30 Washtemperatur: T=65 bis 68°C.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, die

- ein entsprechendes Protein codiert, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus Spezies der Gattung *Oryza*. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) oder durch Amplifikation mittels PCR.
- Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im Wesentlichen die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente oder Oligonucleotide handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, sollte eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erfolgen, um festzustellen, ob es sich um ein OK1 Protein handelt. Hierzu eignen sich insbesondere Homologievergleiche auf der Ebene der Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz sowie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Die Aktivität eines OK1 Proteins kann z.B. wie oben oder unter Allgemeinen Methoden Punkt 11 beschrieben, erfolgen. Eine bevorzugte Bindungsaffinität zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke, und Autophosphorylierung eines OK1 Proteins können nach den oben bereits und unter Allgemeine Methoden Punkte 8 und 12 beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.
- Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein aus Pflanzen, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der

- (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus Spezies der Gattung *Oryza* codieren. Der Begriff „Derivat“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren
- 5 Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Identität zu diesen Sequenzen aufweisen. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei z.B. durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.
- 10 Der Begriff „Identität“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität über die gesamte Länge der codierenden Region von mindestens 60%, insbesondere eine Identität von mindestens 80%, vorzugsweise über 80%, besonders bevorzugt über 90% und insbesondere von mindestens 95%. Unter dem Begriff „Identität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung
- 15 die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren/Nucleotide (Identität) mit anderen Proteinen/Nucleinsäuren, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird die Identität durch Vergleiche der SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 für Aminosäuren oder SEQ. ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 für Nucleinsäuren zu anderen Proteinen/Nucleinsäuren mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen
- 20 Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Vorzugsweise wird die Identität mittels des bekannten und der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogramms ClustalW (Thompson et
- 25 al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) ermittelt. ClustalW wird öffentlich zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique
- 30 et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) und beim EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute,

Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um die Identität zwischen erfindungsgemäßen Proteinen und anderen Proteinen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um die Identität zwischen z.B. der Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und der Nucleotidsequenz von anderen Nucleinsäuremolekülen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

Identität bedeutet ferner, dass funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten. Eine spezielle Form von Derivaten stellen z.B. Nucleinsäuremoleküle dar, die auf Grund der Degeneration des genetischen Codes von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen abweichen.

30

Die von den verschiedenen Derivaten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. biologische Aktivität, Substratspezifität, Molekulargewicht, immunologische

Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.. Bevorzugte Eigenschaften eines OK1  
5 Proteins wurden oben bereits im Detail erörtert und sind hier entsprechend anzuwenden.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise  
10 cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende Moleküle sein, oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle. Sie können einzelsträngige Moleküle sein, die entweder den codierenden oder den nicht codierenden Strang enthalten, oder doppelsträngige Moleküle.

- 15 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül codierend ein R1 Protein ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus
- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 7, SEQ ID NO  
20 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 oder SEQ ID NO 17 angegebenen Aminosäuresequenz codieren,
  - b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14 oder SEQ ID NO 16 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
  - 25 c) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a) oder b) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht;
  - d) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a) oder b) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen und
  - 30 e) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a) oder b) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren.



In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) T-DNA Molekülen, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens führen (T-DNA activation tagging);
  - b) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens führen (Transposon activation tagging);
  - 10 c) DNA Molekülen, die ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codieren und mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein und/oder R1 Protein Aktivität in der Zelle führen,
  - d) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer  
15 Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt.
  - e) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer  
20 Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen R1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines R1 Protein codierenden Gens bewirkt.
- 25 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen auch durch die Verwendung der so genannten Insertionsmutagenese (Übersichtsartikel: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601) hergestellt werden. Unter Insertionsmutagenese ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung  
30 insbesondere das Inserieren von Transposons oder so genannter Transfer DNA (T-DNA) in ein Gen oder in die Nähe eines Gens, codierend ein OK1 Protein und/oder ein codierend ein R1 Protein zu verstehen, wobei dadurch die Aktivität eines OK1 Proteins und/oder eines R1 Proteins in der betreffenden Zelle erhöht wird.

Bei den Transposons kann es sich dabei sowohl um solche handeln, die in der Zelle natürlicherweise vorkommen (endogene Transposons), als auch um solche, die natürlicherweise nicht in besagter Zelle vorkommen, sondern mittels gentechnischer Methoden, wie z.B. Transformation der Zelle, in die Zelle eingeführt wurden (heterologe Transposons). Die Veränderung der Expression von Genen mittels Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt.

- Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA) von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-DNA in einen Abschnitt oder in die Nähe eines Abschnittes des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Erhöhung der Genexpression und damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen codierten Proteins führen.
- Die in das Genom inserierten Sequenzen (insbesondere Transposons oder T-DNA) zeichnen sich dabei dadurch aus, dass sie Sequenzen enthalten, die zu einer Aktivierung von regulatorischen Sequenzen eines OK1 Gens führen ("activation tagging").
- Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und Pflanzen können mit Hilfe der Methode des so genannten "activation taggings" (siehe z. B. Walden et al., Plant J. (1991), 281-288; Walden et al., Plant Mol. Biol. 26 (1994), 1521-1528) erzeugt werden. Diese Methode beruht auf der Aktivierung endogener Promotoren durch "enhancer"-Sequenzen, wie z.B. dem Enhancer des 35S RNA-Promoters des Blumenkohlmosaikvirus oder dem Octopinsynthese-Enhancers.

Unter dem Begriff „T-DNA activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein T-DNA Fragment verstanden werden, das "enhancer"-

Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führt.

- 5 Unter dem Begriff „Transposon activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Transposon verstanden werden, das "enhancer"-Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führt.

10

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen DNA Moleküle, die ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codieren, mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen initiieren (Promotoren) und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein und/oder R1 Protein Aktivität in der Zelle führen.

- 15 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle liegen dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung vor.

Zur Expression von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein und/oder R1 Protein codieren, werden diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-

- 20 Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der

- 25 Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Sowohl in Bezug auf die Pflanze als auch in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic

Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der

- 30 Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al.,

EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor, Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) oder Shrunken-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 9307279). Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren verwendet werden, wie z.B. der USP-Promoter aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

Ferner kann eine Terminationssequenz (Polyadenylierungssignal) vorhanden sein, die der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dient. Dem Poly-A-Schwanz wird eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Es können auch Intronsequenzen zwischen dem Promotor und der codierenden Region vorhanden sein. Solche Intronsequenzen können zur Stabilität der Expression und zu einer erhöhten Expression in Pflanzen führen (Callis et al., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier, et al., 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569). Geeignete Intronsequenzen sind beispielsweise das erste Intron des sh1-Gens aus Mais, das erste Intron des Poly-Ubiquitin Gens 1 aus Mais, das erste Intron des EPSPS Gens aus Reis oder eines der beiden ersten Introns des PAT1 Gens aus Arabidopsis.

Weiterhin können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen mittels der so genannten "*in situ*-Aktivierung", hergestellt werden. Die eingeführte genetische Modifikation bewirkt dabei eine Veränderung der regulatorischen Sequenzen endogener OK1 Gene und/oder R1 Gene, was zu einer verstärkten Expression von OK1 Genen und/oder R1 Genen führt. Bevorzugt geschieht die Aktivierung eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens durch „*in vivo*“ Mutagenese eines Promotors oder von „enhancer“-Sequenzen eines endogenen OK1 Gens und/oder eines R1 Gens. Dabei kann z.B. ein Promotor oder eine „enhancer“-Sequenz durch Mutagenese derart verändert werden, dass die erzeugte Mutation in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einer erhöhten Expression eines OK1 Gens und/oder R1 Gens führt im Vergleich zur Expression eines OK1 Gens und/oder eines R1 Gens in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen. Die Mutation in einem Promotor oder einer „enhancer“-Sequenz kann auch dazu führen, dass OK1 Gene und/oder R1 Gene in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einem Zeitpunkt exprimiert werden, zu welchem sie in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht exprimiert werden.

Unter dem Begriff „OK1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein OK1 Protein, vorzugsweise ein OK1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.

Unter dem Begriff „R1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein R1 Protein, vorzugsweise ein R1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.

Bei der so genannten "*in vivo*-Mutagenese" wird durch Transformation von Pflanzenzellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Pflanzenzellen eingeführt (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic

Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

- 5 Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens und/oder R1 Gens, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens und/oder R1 Gens eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.
- 10 Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nukleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer OK1 Proteine.

15

Alle diese Methoden beruhen auf der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom einer Pflanzenzelle oder Pflanze und sind daher grundsätzlich zu Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und erfindungsgemäßer Pflanzen geeignet.

20

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

25

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Gehalt an Stärkephosphat und/oder der Phosphatverteilung im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke

30 besser geeignet ist.

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die ausschließlich P-Stärke phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Diese ist nun durch Verwendung eines Enzyms mit der Funktion eines OK1  
5 Proteins oder durch die Bereitstellung eines Nucleinsäuremoleküls, das ein OK1 Protein codiert, zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich.

Auch die Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken ist nun durch die Bereitstellung von  
10 Enzymen mit der Funktion von OK1 Proteinen und der Bereitstellung von Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein codieren, durch die vorliegende Erfindung möglich.

Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen  
15 und erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „modifizierte Stärke“ bedeutet in Zusammenhang mit der vorliegenden  
20 Erfindung, dass die Stärke veränderte physiko-chemische Eigenschaften gegenüber nicht modifizierter Stärke, erhältlich aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren  
25 erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

30 Unter dem Begriff „Phosphatverteilung“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil des in C-2-Position, C-3-Position oder C-6-Position eines Glucosemoleküles gebundenen Stärkephosphates bezogen auf den Gesamtgehalt an Stärkephosphat von Stärke verstanden werden.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärken aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff „Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-3-Position bzw. C-6-Position gebundene Stärkephosphat einer Stärke zu der Summe aus dem in C-3-Position und in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat (C-3-Position + C-6-Position) der betreffenden Stärke beiträgt.

Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185) beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

Ferner sind Gegenstand der Erfindung genetisch modifizierte Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl um monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke.



In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Pflanze, eine stärkepeichernde Pflanze.

5 Der Begriff "Stärke speichernde Pflanzen" meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Pflanzen mit Pflanzenteilen, die eine Speicherstärke enthalten, wie z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse, oder Sorghum.

10 Der Begriff „Kartoffelpflanze“ oder „Kartoffel“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Solanum*, besonders Knollen produzierende Spezies der Gattung *Solanum* und insbesondere *Solanum tuberosum*.

15 Der Begriff „Weizenpflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* oder Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* bzw. Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, insbesondere bevorzugt *Triticum aestivum*.

20 Der Begriff „Maispflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders bevorzugt *Zea mais*.

25 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße stärkepeichernde Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*. Bevorzugt handelt es sich dabei um Mais- oder Weizenpflanzen.

30 Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, enthaltend eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle.

Der Begriff „Vermehrungsmaterial“ umfasst dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfasst  
5 beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen und besonders bevorzugt um endospermhaltige Körner.

10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erntebare Pflanzenteile erfindungsgemäßer Pflanzen, wie Früchte, Speicherwurzeln, Wurzeln, Blüten, Knospen, Sprosse oder Stämme, vorzugsweise Samen, Körner oder Knollen, wobei diese erntebaren Teile erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten.

15 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- 20 b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- c) und gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.

25 Für die laut Schritt a) in die Pflanzenzelle eingeführte genetische Modifikation gilt, dass es sich grundsätzlich um jede Art von Modifikation handeln kann, die zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins führt. Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen (z.B. beschrieben in „Plant Cell Culture Protocols“, 1999, ed. by R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

30

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge,

Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt. Die Auswahl erfolgt dabei bevorzugt in der  
5 Weise, dass die weiteren Pflanzen, die nach Schritt c) erzeugt werden, die in Schritt a) eingeführte Modifikation aufweisen.

Die genetischen Modifikationen zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können gleichzeitig oder in aufeinander folgenden Schritten erfolgen.  
10 Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und/oder mindestens eines R1 Proteins führen. Es kann sowohl von Wildtyp-Pflanzen bzw. Wildtyp-Pflanzenzellen ausgegangen werden, in denen noch keine vorherige genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins oder  
15 mindestens eines R1 Proteins erfolgt ist, oder von bereits genetisch modifizierten Pflanzenzellen bzw. Pflanzen, in denen bereits durch eine genetische Modifikation die Aktivität mindestens eines OK1 Proteins oder mindestens eines R1 Proteins erhöht ist. Es ist unerheblich, ob für die genetische Modifikation, die zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins führt, die gleiche Methode verwendet wird wie  
20 für die genetische Modifikation, die zu einer erhöhten Aktivität eines R1 Proteins führt, solange beide genetische Modifikationen zusammen zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins in derselben Pflanzenzelle führen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur  
25 Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das Vorhandensein oder die Expression des/der fremden Nucleinsäuremoleküls/Nukleinsäuremoleküle zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins in der Zelle  
30 führt/führen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die

genetische Modifikation in der Einführung von mindestens einem fremden Nucleinsäuremolekül in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das/die fremde/fremden Nucleinsäuremolekül/Nukleinsäuremoleküle ein OK1 Protein und/oder ein R1 Protein codierende Sequenzen enthalten.

5

Wie oben bereits für zur genetischen Modifikation in die Pflanzenzelle oder Pflanze eingebrachten fremden Nukleinsäuremolekülen beschrieben, kann es sich in Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze um ein einzelnes Nucleinsäuremolekül oder um  
10 mehrere Nucleinsäuremoleküle handeln. Die oben gemachten Ausführungen sind für das hier beschriebene erfindungsgemäße Verfahren entsprechend anzuwenden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die  
15 genetische Modifikation in Schritt a) des Verfahrens in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, welches mindestens eine ein R1 Protein codierende Sequenz und mindestens eine ein OK1 Protein codierende Sequenzen enthält.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur  
20 Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze besteht die genetische Modifikation in Schritt a) des Verfahrens in der Einführung mehrerer fremder Nucleinsäuremoleküle, wobei mindestens ein erstes Nucleinsäuremolekül eine ein R1 Protein codierende Sequenz enthält und mindestens ein zweites Nucleinsäuremolekül eine ein OK1 Protein codierende Sequenzen enthält.

25

Weiterhin können zur Einführung eines fremden Nukleinsäuremoleküls bei der Durchführung erfindungsgemäßer Verfahren anstelle einer Wildtyp-Pflanzenzelle bzw. Wildtyp-Pflanze, eine Mutantenzelle bzw. eine Mutante, die sich dadurch auszeichnet, dass sie bereits eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins oder eine  
30 erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweist, verwendet werden. Die weiter oben gemachten Angaben zur Verwendung von Mutanten für die Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder Pflanzen, sind hier entsprechend anzuwenden.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, ist mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ausgewählt, aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, codiert mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel, Weizen, Reis, Mais, Soyabohne, Citrus oder *Arabidopsis*. Referenzen für die genannten Nucleinsäuresequenzen codierend R1 Proteine aus den genannten Pflanzen sind bereits weiter oben angegeben.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- 10 a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden und
- 15 d) Pflanzen erhalten nach Schritt b) oder c) mit einer Pflanz gekreuzt werden, die eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines R1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

20

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- 25 b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden und
- d) Pflanzen erhalten nach Schritt b) oder c) mit einer Pflanze gekreuzt werden, die eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

30

Dabei können die Pflanzen nach Schritt a) wie bereits oben beschrieben, genetisch modifiziert werden. Die Regeneration von Pflanzen nach Schritt b) und die Erzeugung weiterer Pflanzen nach Schritt c) wurden ebenfalls bereits weiter oben dargestellt.

- 5 Eine Pflanze, die nach Schritt d) der beiden letztgenannten Ausführungsformen mit Pflanzen oder Nachkommen der Pflanzen, erhalten aus Schritt b) oder c), gekreuzt wird, kann jede Pflanze sein, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins bzw. eines R1 Proteins aufweist, im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen. Die Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins bzw. eines R1 Proteins kann dabei durch
- 10 jede Modifikation hervorgerufen sein, die zu einer Erhöhung der Aktivität der betreffenden Proteine in den entsprechenden Pflanzen führt. Es kann sich bei diesen Pflanzen um Mutanten oder mittels gentechnischer Methoden modifizierte Pflanzen handeln. Bei den Mutanten kann es sich sowohl um spontan (natürlich) auftretende Mutanten, als auch um solche handeln, die durch den gezielten Einsatz von
- 15 Mutagenen (wie z.B. chemische Agentien, ionisierende Strahlung) oder gentechnischen Verfahren (z.B. Transposon activation tagging, T-DNA activation tagging, *in vivo*-Mutagenese) erzeugt wurden. Bevorzugt handelt es sich bei den durch gentechnische Verfahren erzeugten Pflanzen um mittels Insertionsmutagenese hergestellte Mutanten, besonders bevorzugt um genetisch modifizierte Pflanzen, die
- 20 ein fremdes Nucleinsäuremolekül exprimieren, insbesondere bevorzugt um genetisch modifizierte Pflanzen, bei welchen das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein bzw. ein R1 Protein codiert.

- In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur
- 25 Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung von Stärke speichernden Pflanzen verwendet.

- In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung
- 30 erfindungsgemäßer Mais- oder Weizenpflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch

modifizierten Pflanze, worin die genetisch modifizierte Pflanze eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist.

10

- In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

- 15 20 Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Pflanzen.

- Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Stärke, isoliert aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins und eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren.

- Insbesondere die erhöhten Mengen an Stärkephosphat erfindungsgemäßer Stärken verleihen den Stärken überraschende und vorteilhafte Eigenschaften. Erfindungsgemäße Stärken tragen durch den erhöhten Anteil an Stärkephosphat einen erhöhten Anteil an geladenen Gruppen, die die funktionellen Eigenschaften der Stärke wesentlich beeinflussen. Stärke, die geladene funktionelle Gruppen trägt, ist insbesondere in der Papierindustrie einsetzbar, wo sie für die Oberflächenbeschichtung (Coating) von Papier verwendet werden. Papier, welches



mit geladenen Molekülen, die außerdem gute Klebeeigenschaften aufweisen, beschichtet ist, eignet sich besonders für die Aufnahme von Farbstoffen, wie z.B. Tinte, Druckfarben etc..

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft auch modifizierte Stärken, erhältlich aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen.
- 10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäß modifizierte Stärke aus stärke-speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Stärke speichernden Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt aus Mais- oder Weizenpflanzen.
- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke, umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder einer erfindungsgemäßen Pflanze, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial einer solchen Pflanze und/oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen einer solchen Pflanze, vorzugsweise
- 20 aus erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfasst ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.
- 25 Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder von Stärke speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen Stärke speichernde Pflanzen beschrieben, z. B. in Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall
- 30 (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z.B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca, Arrowroot und Sago Stärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und

Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57, die Extraktion von  
5 Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das so genannte "wet milling" erreicht.). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

10 Unter dem Begriff „Stärke speichernde Teile“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung solche Teile einer Pflanze verstanden werden, in welchen Stärke, im Gegensatz zu transitorischer Blattstärke, zur Überdauerung von längeren Zeiträumen als Depot gespeichert wird. Bevorzugte Stärke speichernde Pflanzenteile sind z.B. Knollen, Speicherwurzeln und Körner, besonders bevorzugt sind Körner  
15 enthaltend ein Endosperm, insbesondere bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm von Mais- oder Weizenpflanzen.

Modifizierte Stärke, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung modifizierter Stärke, ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden  
20 Erfindung.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen modifizierten Stärken um native Stärken.

25 Der Begriff „native Stärke“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Stärke nach dem Fachmann bekannten Methoden aus erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem erntebaren Pflanzenteilen, erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen oder erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial von Pflanzen isoliert wird.

30

Weiterhin ist die Verwendung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßer Pflanzen zur Herstellung einer modifizierten Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Dem Fachmann ist bekannt, dass die Eigenschaften von Stärke durch z.B. thermische, chemische, enzymatische oder mechanische Derivatisierung verändert werden können. Derivatisierte Stärken sind für verschiedene Anwendungen im

5 Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich besonders geeignet. Die erfindungsgemäßen Stärken sind als Ausgangssubstanz besser geeignet zur Herstellung von derivatisierten Stärken als herkömmliche Stärken, da sie durch den höheren Gehalt an Stärkephosphat einen höheren Anteil an reaktiven funktionalen Gruppen aufweisen.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin erfindungsgemäße modifizierte Stärke, nachträglich derivatisiert wird.

15 Unter dem Begriff „derivatisierte Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine erfindungsgemäße modifizierte Stärke verstanden werden, deren Eigenschaften nach der Isolierung aus pflanzlichen Zellen mit Hilfe von chemischen, enzymatischen, thermischen oder mechanischen Verfahren verändert wurde.

20 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der erfindungsgemäßen derivatisierten Stärke um mit Hitze und/oder mit Säure behandelte Stärke.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um

25 Stärkeether, insbesondere um Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, stickstoffhaltige Stärkeether, phosphathaltige Stärkeether oder schwefelhaltige Stärkeether.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um

30 vernetzte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärke-Pfropf-Polymerisate.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um oxidierte Stärken.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeester, insbesondere um Stärkeester, die unter Verwendung von organischen Säuren in die Stärke eingeführt wurden. Besonders bevorzugt handelt es sich um Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- oder Citratstärken.
- 10 Die erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken eignen sich für verschiedene Verwendungen in der Pharmaindustrie, im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich. Methoden zur Herstellung von erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken sind dem Fachmann bekannt und in der allgemeinen Literatur ausreichend beschrieben. Eine Übersicht zur Herstellung von derivatisierten Stärken
- 15 findet sich z.B. bei Orthoefer (in Corn, Chemistry and Technology, 1987, eds. Watson und Ramstad, Chapter 16, 479-499).

Derivatisierte Stärke, erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden

20 Erfindung.

Ferner ist die Verwendung erfindungsgemäßer modifizierter Stärken zur Herstellung von derivatisierter Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- 25 Stärke speichernde Teile von Pflanzen werden oft zu Mehlen verarbeitet. Beispiele für Teile von Pflanzen, aus welchen Mehle hergestellt werden, sind z.B. Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Getreidepflanzen. Zur Herstellung von Mehlen aus Getreidepflanzen werden die endospermhaltigen Körner dieser Pflanzen gemahlen und gesiebt. Stärke ist ein Hauptbestandteil des Endosperms. Bei anderen Pflanzen,
- 30 die kein Endosperm, sondern andere Stärke speichernde Teile, wie z.B. Knollen oder Wurzeln enthalten, wird Mehl häufig durch Zerkleinern, Trocknen und anschließendem Mahlen der betreffenden Speicherorgane hergestellt. Die Stärke des Endosperms oder enthaltend in Stärke speichernden Teilen von Pflanzen ist ein

wesentlicher Anteil des Mehls, welches aus den betreffenden Pflanzenteilen hergestellt wird. Die Eigenschaften von Mehlen werden daher auch durch die in dem betreffenden Mehl vorliegende Stärke beeinflusst. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen synthetisieren eine veränderte Stärke im Vergleich  
5 zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Mehle, hergestellt aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßen erntebaren Teilen weisen daher veränderte Eigenschaften auf. Die Eigenschaften von Mehlen können auch durch  
10 Mischen von Stärke mit Mehlen oder durch das Mischen von Mehlen mit unterschiedlichen Eigenschaften beeinflusst werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher Mehle, enthaltend eine erfindungsgemäße Stärke.

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Mehle, die aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen  
20 hergestellt sind. Bevorzugte Stärke speichernde Teile erfindungsgemäßer Pflanzen sind Knollen, Speicherwurzeln und ein Endosperm enthaltende Körner. Vorzugsweise stammen Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Pflanzen der (systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt stammen Körner von Mais- oder Weizenpflanzen.

25

Unter dem Begriff „Mehl“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein durch Mahlen von Pflanzenteilen erhaltenes Pulver verstanden werden. Gegebenenfalls werden Pflanzenteile vor dem Mahlen getrocknet und nach dem Mahlen zerkleinert und/oder gesiebt.

30

Erfindungsgemäße Mehle zeichnen sich auf Grund der in ihnen vorliegenden Stärke, die einen veränderten Phosphatgehalt und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweisen insbesondere durch ihr erhöhtes Wasserbindevermögen aus. Diese ist

z.B. bei der Verarbeitung von Mehlen in der Lebensmittelindustrie für viele Anwendungen, insbesondere bei der Herstellung von Backwaren gewünscht.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur  
5 Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von  
erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, von Teilen  
erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen  
Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßigem  
erntebarem Material.

10

Mehle können durch Mahlen von Stärke speichernden Teilen von  
erfindungsgemäßen hergestellt werden. Dem Fachmann ist bekannt, wie er Mehle  
herstellt. Vorzugsweise umfasst ein Verfahren zur Herstellung von Mehlen auch den  
Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des  
15 Vermehrungsmaterials bzw. der Stärke speichernden Teile dieser Pflanzen vor dem  
Mahlen und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung  
erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Unter dem Begriff „Teile von Pflanzen“ sollen im Zusammenhang mit der  
20 vorliegenden Erfindung alle Teile einer Pflanze verstanden werden, die als  
Bestandteile in ihrer Gesamtheit eine vollständige Pflanze darstellen. Teile von  
Pflanzen sind z.B. Sprosse, Blätter, Rhizome, Wurzeln, Rüben, Knollen, Schoten,  
Samen oder Körner.

25 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das  
Verfahren zur Herstellung von Mehlen eine Prozessierung von erfindungsgemäßen  
Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von  
erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder von erfindungsgemäßigem  
erntebarem Material vor dem Mahlen.

30 Die Prozessierung kann dabei z.B. eine Hitzebehandlung und/oder eine Trocknung  
sein. Hitzebehandlung gefolgt von einer Trocknung des Hitze behandelten Materials  
wird z.B. bei der Herstellung von Mehlen aus Speicherwurzeln oder Knollen wie z.B.  
aus Kartoffelknollen angewendet, bevor die das Mahlen erfolgt. Die Zerkleinerung

von erfindungsgemäßen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen  
erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder  
von erfindungsgemäßigem erntebarem Material vor dem Mahlen kann ebenfalls eine  
Prozessierung im Sinne der vorliegenden Erfindung darstellen. Die Entfernung von  
5 pflanzlichem Gewebe, wie z.B. von Spelzen der Körner, vor dem Mahlen stellt auch  
eine Prozessierung vor dem Mahlen in Sinne der vorliegenden Erfindung dar.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das  
Verfahren zur Herstellung von Mehlen nach dem Mahlen eine Prozessierung des  
10 Mahlgutes.

Das Mahlgut kann dabei z.B. nach dem Mahlen gesiebt werden, um z.B.  
verschiedene Typenmehle herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von  
15 erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen  
Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von  
erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder  
erfindungsgemäßigem erntebarem Material zur Herstellung von Mehlen.

20 Es ist auch Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel, wie z.B. DNA Moleküle zur  
Erzeugung von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen  
Pflanzen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen  
bzw. Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren, zur Verfügung zu  
stellen. Die zur Verfügung gestellten DNA Moleküle beinhalten  
25 Nucleinsäuresequenzen, welche ein OK1 Protein codieren. Ein Protein mit der  
enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins war dem Fachmann bisher nicht  
bekannt. Daher konnten auch keine DNA Moleküle zur Verfügung gestellt werden,  
die es erlauben, erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen  
und die von ihnen synthetisierte Stärke bzw. die aus ihnen gewonnenen Mehle zu  
30 erzeugen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.

- 5 Unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül verstanden werden, welches sowohl Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein, als auch Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, enthält und bei welchem die Nucleinsäuresequenzen codierend ei OK1 Protein und ein R1 Protein in einer
- 10 Anordnung vorliegen, wie sie natürlicherweise im Genom eines Organismus nicht vorliegen. Neben Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein kann das rekombinante Nucleinsäuremolekül noch zusätzliche Sequenzen enthalten, welche natürlicherweise nicht in einer solchen Anordnung vorliegen, wie sie in
- 15 erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen vorliegen. Die genannten zusätzlichen Sequenzen können dabei beliebige Sequenzen sein, bevorzugt handelt es sich dabei um regulatorische Sequenzen (Promotoren, Terminationssignale, Enhancer), besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen, die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, besonders bevorzugt um
- 20 regulatorische Sequenzen die in Stärke speicherndem pflanzlichem Gewebe aktiv sind. Methoden zur Erzeugung erfindungsgemäßer rekombinanter Nucleinsäuremoleküle sind dem Fachmann bekannt und umfassen gentechnische Methoden wie z.B. die Verbindung von Nucleinsäuremolekülen durch Ligation, genetische Rekombination oder die Neusynthese von Nucleinsäuremolekülen (siehe
- 25 z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5<sup>th</sup> edition ( 2002), ISBN: 0471250929).
- 30 Eine weitere Ausführungsform von erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung betreffen Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige



Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

5 In einer weiteren Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren. Der Begriff "Expression" kann dabei Transkription als auch Transkription und Translation bedeuten. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung, und/oder in „antisense“-  
10 Orientierung vorliegen. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremoleküle können dabei gemeinsam unter der Kontrolle eines einzigen regulatorischen Elementes stehen, oder sie können jeweils ein eigenes regulatorisches Element aufweisen.

15 Regulatorische Sequenzen zur Expression in prokaryontischen Organismen, z.B. *E. coli*, und in eukaryontischen Organismen sind ausreichend in der Literatur beschrieben, insbesondere solche zur Expression in Hefe, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*. Eine Übersicht verschiedener Systeme zur Expression für Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen findet man z. B. in Methods in Enzymology 153  
20 (1987), 383-516 und in Bitter et al. (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle, die genetisch modifiziert ist mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekül  
25 und/oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die die erfindungsgemäße genetische Modifikation enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere  
30 prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurden, sowie Wirtszellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten.

Die Wirtszellen können Bakterien- (z.B. *E. coli*, Bakterien der Gattung *Agrobacterium* insbesondere *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*) oder Pilzzellen (z.B. Hefe, insbesondere *S. cerevisiae*, *Agaricus*, insbesondere *Agaricus bisporus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*), sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein. Der Begriff "transformiert" bedeutet dabei, dass die erfindungsgemäßen Zellen mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül genetisch modifiziert sind insofern, als sie zusätzlich zu ihrem natürlichen Genom mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten. Dieses kann in der Zelle frei, gegebenenfalls als selbstreplizierendes Molekül, vorliegen oder es kann stabil in das Genom der Wirtszelle integriert vorliegen.

Vorzugsweise sind die Wirtszellen Mikroorganismen. Darunter werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung alle Bakterien und alle Protisten (z. B. Pilze, insbesondere Hefen und Algen) verstanden, so wie sie z. B. in Schlegel "Allgemeine Mikrobiologie" (Georg Thieme Verlag (1985), 1-2) definiert sind.

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen. Dabei kann es sich prinzipiell um Pflanzenzellen aus jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzenzellen und Pflanzen aus Stärke speichernden Pflanzen (Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse oder Sorghum), bevorzugt Pflanzenzellen aus Pflanzen der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Mais- oder Weizenpflanzen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül, oder einen erfindungsgemäßen Vektor. Bevorzugt sind erfindungsgemäße Zusammensetzungen, enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Wirtszelle.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Pflanzenzelle, insbesondere bevorzugt um eine Zelle einer Mais- oder Weizenpflanze.

5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.

Die Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein bzw. codierend ein R1 Protein können dabei zusammen auf einem einzigen Nucleinsäuremolekül, oder auf voneinander getrennten Nucleinsäuremolekülen vorliegen.

10

Ein weiterer Aspekt erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft Zusammensetzungen, die zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Wirtszellen, bevorzugt zur Erzeugung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen verwendet werden können. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine Zusammensetzung, enthaltend

15 Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und einen biolistischen Träger, welcher zur Einführung von Nucleinsäuremolekülen in eine Wirtszelle geeignet ist. Bevorzugte biolistische Träger sind Partikel aus Wolfram, Gold oder  
20 Kunststoffen.

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft Zusammensetzungen enthaltend Nucleinsäuresequenzen codierend ein OK1 Protein und Nucleinsäuresequenzen codierend ein R1 Protein, ein erfindungsgemäßes  
25 rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Pflanzenzelle und ein synthetisches Kulturmedium. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen zusätzlich zu Pflanzenzellen und synthetischem Kulturmedium auch Polyethylenglykol (PEG). Bei diesen Zusammensetzungen liegt das erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül außerhalb der Pflanzenzelle  
30 vor, d.h. es befindet sich außerhalb des von einer Cytoplasmamembran umschlossenen Zellinneren der Pflanzenzelle.

Synthetische Kulturmedien, die zur Kultivierung und/oder zur Transformation von Pflanzenzellen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und z.B. ausreichend in

der Literatur beschrieben. Viele unterschiedliche synthetische Kulturmedien sind auch im Fachhandel käuflich erwerbbar (z.B. DUCHEFA Biochemie B.V., Belgien).

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung erfindungsgemäßer  
5 Zusammensetzungen zur Transformation von Pflanzenzellen.

### Beschreibung der Sequenzen

- 10 SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren OK1-pGEM-T und OK1-pDEST™17 und inseriert.
- SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend ein A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.
- 15 SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50 inseriert.
- SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend ein O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten  
20 Nucleinsäuresequenz ableitbar.
- SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1 Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, und *Oryza sativa*.
- SEQ ID NO 6: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines C.r.-R1 Proteins aus *Citrus reticulata*.
- 25 SEQ ID NO 7: Aminosäuresequenz codierend ein C,r.-R1 Protein aus *Citrus reticulata*.
- SEQ ID NO 8: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines A.t.-R1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*.
- SEQ ID NO 9: Aminosäuresequenz codierend ein A.t.-R1 Protein aus  
30 *Arabidopsis thaliana*.
- SEQ ID NO 10: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines S.t.-R1 Proteins aus *Solanum tuberosum*.

SEQ ID NO 11: Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-R1 Protein aus *Solanum tuberosum*.

SEQ ID NO 12: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines O.s.-R1 Proteins aus *Oryza sativa*.

5 SEQ ID NO 13: Aminosäuresequenz codierend ein O.s.-R1 Protein aus *Oryza sativa*

SEQ ID NO 14: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region eines G.m.-R1 Proteins aus *Glycine max*.

10 SEQ ID NO 15: Aminosäuresequenz codierend das S.t.-R1 Protein aus *Glycine max*.

SEQ ID NO 16: Nucleinsäuresequenz enthaltend eine codierende Region eines Z.m.-R1 Proteins aus *Zea mays*.

SEQ ID NO 17: Aminosäuresequenz codierend ein Z.m.-R1 Protein aus *Zea mays*.

15

### Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* sex1-3 Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* sex1-3 Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

20

25

30

Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2: Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an <sup>33</sup>P markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B) eingeführt wurde.

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit <sup>33</sup>P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert. ). R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit <sup>33</sup>P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der

Stärke durchgeführt und die erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in  
5 einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit Fraktion 15 eluierte das zugegebene Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den einzelnen Fraktionen gemessene Menge an  $^{33}\text{P}$  markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per  
10 minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten-Stärke eingeführt wurde, ist graphisch dargestellt.

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt  
15 einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation  
20 wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf  
25 Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertes ATP oder randomisiertes  $^{33}\text{P}$  ATP eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten  
30 Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

Fig. 7 Nachweis der Steigerung der Phosphorylierungsaktivität in Phosphorylierungsreaktionen, wenn R1 Proteine und OK1 Proteine gleichzeitig an der Reaktion beteiligt sind. Dargestellt ist der Einbau von Phosphat, ausgehend von radioaktiv markiertem ATP (randomisiertes  $^{33}\text{P}$ -ATP), in die betreffenden Stärken durch Messung der Radioaktivität (cpm) in die unterschiedlichen Stärken. Weizenstärke wurde dazu in nativer Form mit R1 Protein (Ansatz 1-1, Ansatz 1-2) oder OK1 Protein (Ansatz 2), oder in Form von *in vitro* phosphorylierter Weizenstärke mit OK1 Protein (Ansatz 3) inkubiert. Ansatz 4 enthielt native Weizenstärke, die gleichzeitig mit R1 Protein und OK1 Protein inkubiert wurde. Jeder Ansatz wurde in drei Wiederholungen durchgeführt. Zum Vergleich ist die Summe der in den jeweiligen Ansätzen 1-2 und Ansätzen 3 dargestellt.

Fig.8 Nachweis der gesteigerten Aktivität durch das Zusammenwirken von einem R1 Protein und einem OK1 Protein. Mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierte Weizenstärke wurde für 10 Minuten bzw. 30 Minuten mit gereinigtem R1 (Ansatz 1) Protein oder gereinigtem OK1 Protein (Ansatz 2) in getrennten Reaktionsansätzen unter Verwendung von randomisiertem  $\beta/\gamma$ - $\text{P}^{33}\text{ATP}$  inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurde die gleiche phosphorylierte Weizenstärke gleichzeitig mit einem R1 Protein und einem OK1 Protein (Ansatz 3) inkubiert. Für alle Reaktionsansätze wurde die Menge des an die Stärke gebundenen Phosphats im jeweiligen Reaktionsansatz nach erfolgter Inkubation mittels Messung im Szintillationszähler bestimmt. Ebenfalls in der Abbildung dargestellt ist die Summe der Reaktionsansätze, bei welchen jeweils nur eines der beiden Enzyme für die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt wurde.

## Allgemeine Methoden

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die



vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt, dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher Weise ausführen kann.

5

## 1. Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

### a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte  
10 Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte  
15 Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

### b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine

Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und  
20 sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und  
25 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

### c) Entsalzen der ausgefällten Proteine

Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule  
30 (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten

Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben,  
5 bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (**Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254**).

10

e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

Bindungspuffer:	50 mM	HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2
	1 mM	EDTA
	2 mM	Dithioerythritol (DTE)
15	2 mM	Benzamidin
	2 mM	$\epsilon$ -Aminocapronsäure
	0.5 mM	PMSF
	0.02 %	Triton X-100

## 2. Isolierung von Blattstärke

20 a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blendor für  
25 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein Nylonnetz (100  $\mu$ m Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

30 Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze

unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60 µm, 30 µm, 20 µm) gegeben. Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene  
5 Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg,).

c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine

Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine  
10 enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei ein Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen.

15

d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke

Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreiten Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem  
20 Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.

e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke

25 Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.

Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer  
30 *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen

Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem

5 Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer linearen mathematischen Funktion folgen.

f) Aufbewahrung isolierter Stärke

Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche

10 verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

15

g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0  
0.2 mM EDTA  
0.5 % Triton X-100

20

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

**3. Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins**

25 a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert

Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird

30 zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert

wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag besteht aus sechs direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

#### 25 b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm, der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbarem Promotor (lacZ) chromosomal codieren.

Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

5

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*

Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 10 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer 15 entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD<sub>600</sub>) von ca. 0,8 inkubiert.

Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke 20 phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B. der Expressionsvektor pDEST™17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels IPTG), so wird nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 der in Hauptkultur der betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 25 erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt werden.

#### 4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins

30 a) Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen  
Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g

Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW 2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird zentrifugiert (12 Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.

10 b) Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins

Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry (Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polystyren Säule (Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufriedenstellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert. Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

5 pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche

Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

10 Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

50 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

15 Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

75 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

20 Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

25 **5. Rekombinante Expression eines R1 Proteins**

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3.

Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante

30 Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden.



## 6. Reinigung eines R1 Proteins

Die Aufreinigung eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 4. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden, wenn durch Expression von R1 in *E. coli* Zellen ein R1 Fusionsprotein entsteht, welches einen His-tag enthält.

## 7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke

### a) In vitro Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke

Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Endosperm von Mais- bzw. Weizenpflanzen oder mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden beschriebenen Methode aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten), wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca. 800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer von entfernt. Alle Waschschriffe finden jeweils bei Raumtemperatur für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschriff erfolgt eine Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

### b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

R1-Puffer:	50 mM	HEPES/KOH, pH 7,5
	1 mM	EDTA
	6 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	ATP

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

## **8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke**

- 5 a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen

Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach 15 Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen werde. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inclusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je 20 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

25

- b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen

Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-30 Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm,

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

10	6 %	SDS
	30 %	Glycerin
	~ 0,015 %	Bromphenolblau
	60 mM	DTE (frisch zusetzen!)

### 9. Auftrennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

30

## **10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen**

a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke

5 Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese und anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.

15

Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen

Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen  
20 Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin  
25 aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch die Kenntnis der theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBI  
30 <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot  
<http://cbg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine

verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von  
5 Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist allein auf Vorhersagen,  
10 jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung  
15 abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter  
20 Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5 µl bis 10 µl) aufgenommen und in ca. 0,5 µl Portionen auf einen Träger aufgetropft.  
25 Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix ( $\epsilon$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Bruker Reflex<sup>TM</sup> II, Bruker Daltonics, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau  
30 gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte  $\alpha$ -1,4-Glucane binden und/oder P- $\alpha$ -1,4-Glucane als Substrat benötigen.

## 11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins

a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist,

- 5 können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (0,01 µg bis 5,0 µg pro mg eingesetzter Stärke) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die
- 10 Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln
- 15 durchgeführt. Nach jedem Waschschrift werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt. Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise
- 20 wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste

- 25 Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf des Vorliegen von radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail (z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN
- 30 COULTER™) analysiert.

c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substrat verwenden

Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht-phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht-phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substrat für eine weitere Phosphorylierungsreaktion benötigen.

d) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Phosphorylierungs-Puffer:

50 mM HEPES/KOH, pH 7,5

1 mM EDTA

6 mM  $MgCl_2$

0,01 bis 0,5 mM ATP

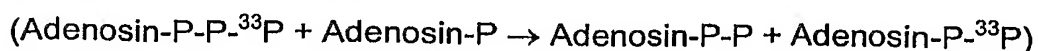
0,2 bis 2  $\mu Ci$  pro ml randomisiertes  $^{33}P$ -ATP (alternativ kann auch ATP eingesetzt werden, welches einen spezifisch in beta-Position markierten Phosphatrest enthält)

Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP ist im Folgenden beschrieben.

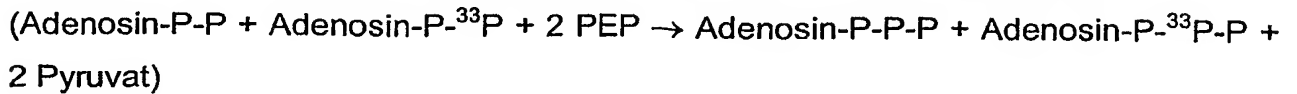
i) Herstellung von randomisiertem ATP

Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu Grunde:

1. Reaktionsschritt:



2. Reaktionsschritt:



- 5 Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser Reaktion eine Mischung aus größtenteils  $\beta^{33}\text{P-ATP}$  und etwas  $\gamma^{33}\text{P-ATP}$ .

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

- 10 ATP (100  $\mu\text{Ci}$ , 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ), wird mit 2  $\mu\text{l}$  Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90  $\mu\text{l}$  Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen
- 15 Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

- 20 Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2  $\mu\text{l}$  Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3  $\mu\text{l}$  50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 12 Minuten gestoppt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisierte ATP
- 25 enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

- 30 15  $\mu\text{l}$  Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C) werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27  $\mu\text{l}$  Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

iv) Verwendete Puffer

Pyruvatkinasepuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,5



	1 mM	EDTA
Randomisierungspuffer:	100 mM	HEPES/KOH pH 7,5
	1 mM	EDTA
5	10 %	Glycerol
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	5 mM	KCl
	0,1 mM	ATP
	0,3 mM	AMP
10		

## 12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl  
15 Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender  
20 Polyacrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

## 13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke phosphorylierendes Protein eingeführt werden

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung  
30 der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch

ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane

- 5 Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der
- 10 von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an

15 markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

- Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können
- 20 (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B. Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit H<sub>2</sub>O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca.
- 25 0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60
- 30 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

	Eluent C	Eluent D
0 Minuten	99%	1%
30 Minuten	0%	100%
35 Minuten	0%	100%
5 Stop des Laufes		

Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt phosphoryliert wird.

#### c) Verwendete Puffer

Eluent C: 100 mM NaOH  
 Eluent D: 100 mM NaOH  
 500 mM Natriumacetat

#### 14. Transformation von Reispflanzen

Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

## **15. Transformation von Weizenpflanzen**

Weizenpflanzen wurden nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert.

## **5 16. Transformation von Maispflanzen**

Unreife Embryonen von Maispflanzen der Linie A188 wurden nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert.

## **17. Bestimmung des Gehaltes an Stärkephosphat**

### **10 a) Bestimmung des C-6-Phosphatgehaltes**

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von  
15 den Überständen werden 7µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim)  
20 gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

### **b) Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes**

Die Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames  
25 (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger  
30 Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

c) Bestimmung des Gehaltes an C-6-Phosphat und C-3-Phosphat

Zur Bestimmung des Gehaltes an Phosphat, welcher in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebunden ist, können die betreffenden Glucane nach Totalhydrolyse nach der unter Allgemeine Methoden 13 angeführten Methode mittels HPAE aufgetrennt werden. Die Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat können durch Integration der einzelnen, nach HPEA Auftrennung erhaltenen Peakflächen ermittelt werden. Durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen für Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in unbekannten Proben, mit den Peakflächen, die nach Auftrennung mittels HPEA mit bekannten Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat erhalten werden, kann die Menge von Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in den zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

15

**Beispiele**

1. Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist

20

a) Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*

Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (Frischgewicht) von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren hergestellt.

25

b) Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von *sex1-3* Mutanten von *Arabidopsis thaliana*

Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert.

30

- c) *In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein

Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschriebenen Verfahren verwendet.

- 10 d) Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

- 20 Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen Proteinextrakt.

- e) Auftrennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese

- 30 Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es

ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

5

- f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie  
10 unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt. Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in Datenbanken (Mascot: [http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html); ProFound: [http://129.85.19.192/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe); PepSea:  
15 <http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem  
20 Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht. Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein. SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP  
25 198009.1, NCBI) Abweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der Datenbank vorliegt (ACC.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

## 30 2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert

Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA, isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang

mittels reverser Transkriptase SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018) synthetisiert, welcher dann unter Verwendung von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod. Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den

5 Vektor pGEM®-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird mit A.t.-OK1-pGEM bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA Sequenz wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz,

10 codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der

15 Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA

5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf

20 Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1<sup>st</sup> Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

25 1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese

0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)

0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1 95°C 2 min

30 Schritt 2 94°C 20 sec

Schritt 3 62°C 30 sec (Temp. pro Zyklus -0.67°C)

Schritt 4 68°C 4 Minuten

Schritt 5 94°C 20 sec



Schritt 6      56°C 30 sec

Schritt 7      68°C 4 Minuten (+ 5 sec pro Zyklus)

Schritt 8      68°C 10 Minuten

Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen  
5 Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur  
des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend  
erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen.  
Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit  
des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde  
10 die Reaktion auf 4°C gekühlt.

### **3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins**

Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach  
Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM als  
15 Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den  
Vektor pDONOR™ 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend  
wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch  
sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17™ (Invitrogen  
Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-  
20 pDEST™17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der  
das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDEST™17  
vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDEST™17 stammenden Nucleotide,  
die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind,  
codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon  
25 (ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach  
Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-  
OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren,  
codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem  
Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem  
30 Vektor pDEST™17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

#### 4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in *E. coli*

Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST<sup>TM</sup>17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert. Eine Beschreibung dieses Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3.,  
5 Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone, enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST<sup>TM</sup>17, dienten zunächst zur Herstellung einer Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von  
10 ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen  
15 der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt wurden.

#### 5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach  
20 Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

#### 6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte  
25 nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein, in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl  
30 Phosphorylierungspuffer enthaltend 0,05 mM radioaktiv (<sup>33</sup>P) markiertes, randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.000 cpm, ca. 0,55 µCi) für 30 Minuten bei

Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C) wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

- 5 Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht (siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

10 Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des Ok1 Proteins

- Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird, signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substart benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substart von dem OK1 Protein akzeptiert wird.

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem

Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta-Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

5

## 7. Nachweis der Autophosphorylierung

Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem  
10 ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5  
15 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und  
20 mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt wurde.

25 In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Dieses ist daraus zu schließen, dass bei  
30 diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.

In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze.

Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säurelabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.

Wird rekombinant exprimiertes OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit  $^{33}\text{P}$  markiertem ATP inkubiert, so kann keine Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu

erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann. Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der  
5 Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden wird.

#### **8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle von Stärke**

##### **10 a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke**

Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke  
15 ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils <sup>33</sup>P markiertes ATP (ca.  $2,5 \times 10^6$  cpm) enthielt, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante  
20 von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation  
25 (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert und 100 µl jedes Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

5

b) Totalhydrolyse der P-Stärke

Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.

Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H<sub>2</sub>O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
Ansatz B (R1):	2518 cpm/10 µl	30.216 cpm/120 µl	252 cpm/µl

30

c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt.. Die Proben zur Auftrennung der filtrierten Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1): 43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

10 Ansatz B (R1): 16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B (entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur Auftrennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion 17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe<sup>TM</sup>, BECKMANN) gemischt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERT<sup>TM</sup>) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden folgende Meßwerte erhalten:



	Gesamt cpm je Fraktion	
	Ansatz (OK1)	AAAnsatz B (R1)
Fr 13	8,7	3,3
Fr 14	13,1	32,2
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8
Fr 16	399,8	112,3
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6
Fr 18	196,7	17,3
Fr 19	6,7	18,9
Summe	2581,5	2938,3
Auftrag	3000,0	3000,0
Wiederfindung	86,0%	97,9%

**Tabelle 4:** Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

5

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

## 9. Steigerung der Phosphorylierungsrate bei gleichzeitiger Katalyse der Phosphorylierungsreaktion durch R1 Proteine und OK1 Protein

### a) *In vitro* Phosphorylierung von Weizenstärke

35 mg Weizenstärke (Sigma, Prod. Nr.: S-5127) pro ml Reaktionsansatz wurden  
5 nach dem unter Punkt 7, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren *in vitro*  
phosphoryliert. Dazu wurde gereinigtes R1 Protein in einer Konzentration von 0,23  
 $\mu\text{g}$  pro mg eingesetzter Stärke und ATP in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  verwendet.  
Die Reaktionszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. In einem parallelen  
Reaktionsansatz der anstelle von ATP randomisiertes  $^{33}\text{P}$ -ATP enthielt, wurde die  
10 Menge des eingebauten Phosphates in die Stärke (0,0054 nmol pro mg Stärke) und  
die spezifische Aktivität des verwendeten R1 Proteins (0,41 nmol pro (mg Protein x  
Minute) bestimmt. Bei dieser Bestimmung wurde nicht beachtet, dass randomisiertes  
ATP verwendet wurde. Die erhaltenen Werte sind daher niedriger, als die tatsächlich  
vorliegenden Werte, da randomisiertes ATP neben in beta-Position markierten  
15 Phosphatresten auch in gamma-Position markierte Phosphatreste enthält.

### b) Phosphorylierung von nativer Weizenstärke und *in vitro* phosphorylierter Weizenstärke durch R1 und/oder OK1 Proteine

15 mg Weizenstärke (Sigma, Prod. Nr.: S-5127, oder nach der unter a)  
20 beschriebenen Methode *in vitro* phosphorylierte Weizenstärke) wurden in 430  $\mu\text{l}$  des  
unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Puffers, enthaltend 11 nmol  
randomisiertes  $^{33}\text{P}$ -ATP (ca.  $1,5 \times 10^6$  cpm) für eine Stunde unter Schütteln bei  
Raumtemperatur mit gereinigten Stärke phosphorylierenden Enzymen inkubiert. Die  
einzelnen Reaktionsansätze enthielten folgende Proteine und Substrate:

	Protein	Substart
<b>Ansatz 1-1</b>	Gereinigtes R1 Protein (3,4 µg)	Weizenstärke (Sigma)
<b>Ansatz 1-2</b>	Gereinigtes R1 Protein (3,4 µg)	Weizenstärke (Sigma)
<b>Ansatz 2</b>	Gereinigtes OK1 Protein (6,0 µg)	Weizenstärke (Sigma)
<b>Ansatz 3</b>	Gereinigtes OK1 Protein (6,0 µg)	<i>In vitro</i> phosphorylierte Weizenstärke
<b>Ansatz 4</b>	Gereinigtes R1 Protein (3,4 µg) Gereinigtes OK1 Protein (6,0 µg)	Weizenstärke (Sigma)
<b>Kontrolle</b>	Kein Protein	Weizenstärke (Sigma)

Jeder dieser Ansätze wurde in jeweils drei Wiederholungen durchgeführt.

Die Behandlung der einzelnen Reaktionsansätze nach einer Stunde Reaktionszeit und die Bestimmung der in die betreffenden Substrate jeweils eingebauten Menge an

- 5 Phosphat wurde nach den unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

	Wiederholung 1 [cpm]	Wiederholung 2 [cpm]	Wiederholung 3 [cpm]
Ansatz 1-1	11722	11584	11428
Ansatz 1-2	12900	12204	11401
Ansatz 2	-28	-21	-30
Ansatz 3	2448	2281	2334
Ansatz 4	17333	20337	16546
Summe aus Ansatz 1-2 und Ansatz 3	15348	14485	13735

10 Tabelle 5: Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in den einzelnen Wiederholungen der einzelnen Reaktionsansätze. Die angegebenen Messwerte

wurden ermittelt, indem von den tatsächlichen Messwerten jeweils die Messwerte der zugehörigen Kontrolle subtrahiert wurden.

Aus der Tabelle wird deutlich, dass native Weizenstärke (Sigma, Prod. Nr.: S-5127) kein Substrat für OK1 Proteine darstellt, wohingegen *in vitro* phosphorylierte Weizenstärke von OK1 Proteinen phosphoryliert werden kann. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Aktivität bei gleichzeitigem Vorliegen eines R1 Proteins und eines OK1 Proteins im Reaktionsgemisch signifikant höher ist, als die Summe der entsprechenden Einzelaktivitäten.

10

c) Phosphorylierung von *in vitro* phosphorylierter Weizenstärke durch R1 und/oder OK1 Proteine

Phosphorylierte Weizenstärke wurde nach dem unter a) beschriebenen Verfahren hergestellt. Die Menge an Stärke gebundenem Phosphat betrug 0,0048 mg

15 Phosphat pro mg Stärke. Bei dieser Bestimmung wurde ebenfalls wie unter a) beschrieben, nicht beachtet, dass randomisiertes ATP verwendet wurde.

15 mg *in vitro* phosphorylierte Weizenstärke wurden nach den unter b) beschriebenen Verfahren mit Stärke phosphorylierenden Enzymen inkubiert. Die einzelnen Reaktionsansätze enthielten folgende Proteine und Substrate:

20

	Protein	Substrat
<b>Ansatz 1: R1</b>	Gereinigtes R1 Protein (3,4 µg)	<i>In vitro</i> phosphorylierte Weizenstärke
<b>Ansatz 2: OK1</b>	Gereinigtes OK1 Protein (5,2 µg)	<i>In vitro</i> phosphorylierte Weizenstärke
<b>Ansatz 3: R1+OK1</b>	Gereinigtes R1 Protein (3,4 µg) Gereinigtes OK1 Protein (5,2 µg)	<i>In vitro</i> phosphorylierte Weizenstärke

Jeder dieser Ansätze wurde in jeweils zwei Wiederholungen durchgeführt.

Je Reaktionsansatz wurde eine Probe nach 0, 10 und 30 Minuten Inkubationszeit gestoppt und die unter den jeweiligen Reaktionsbedingungen eingebaute Menge an

Phosphat wurde nach dem unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 beschriebenen Verfahren ermittelt.

Als Kontrolle wurde native Weizenstärke mit R1 Protein in Anwesenheit von nicht radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch  
5 randomisiertes  $^{33}\text{P}$ -ATP und Puffer zugesetzt, bevor die Reaktion gestoppt wurde.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

	0 Minuten Reaktionszeit	10 Minuten Reaktionszeit	30 Minuten Reaktionszeit
Ansatz 1	0 cpm	2378 cpm	7543 cpm
Ansatz 2	0 cpm	2032 cpm	3005 cpm
Ansatz 3	0 cpm	7570 cpm	16245 cpm
Summe aus Ansatz 1 und Ansatz 2	0 cpm	4410 cpm	10548 cpm

Tabelle 6: Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in den einzelnen  
10 Wiederholungen der einzelnen Reaktionsansätze. Die angegebenen Messwerte wurden ermittelt, indem von dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen die Messwerte der zugehörigen Kontrolle subtrahiert wurden.

### 10. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

15 Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt. Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein  
20 benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz

codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend das A.t.-OK1 Protein auf.

5

Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein aus Reis der Varietät M202 kodiert.

10 Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

1. Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os\_ok1-F6 (AAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.

15

2. Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F4 (CCAGGTAAAGTTTGGTGAGCA) und Os\_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120 bezeichnet.

25

3. Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F7 (TTGTTGCGGGATATTGTCAGA) und Os\_ok1-R7 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA

30

von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121 bezeichnet.

5 4. Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter  
SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser  
Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der  
synthetischen Oligonukleotide Os\_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und  
Os\_ok1-R4 (GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen  
10 Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor  
pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid  
wurde mit pML119 bezeichnet.

15 5. Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit  
Hilfe der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen  
Oligonukleotide Os\_ok1-F3 (CATTTGGATCAATGGAGGATG) und Os\_ok1-R2  
(CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von  
Reis amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1  
(Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde  
mit pML122 bezeichnet.

20 Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte  
folgendermaßen:

Ein 700 Basenpaare langes *Apal*-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen  
Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die *Apal*-Schnittstelle von pML121 kloniert.  
Das erhaltene Plasmid wurde mit pML47 bezeichnet.

25 Ein 960 Basenpaare langes Fragment enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche  
der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion  
amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os\_ok1-F4 (s. o.) und Os\_ok1-R9 (s. o.) je in  
einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os\_ok1-F6 und Os\_ok1-R6 je in einer  
Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den  
Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene  
30 Plasmid wurde mit pML44 bezeichnet.

Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer *Xho*I-Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os\_ok1-F3 (s. o.) und Os\_ok1-R2*Xho* (AAAACTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) reamplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene

5 Plasmid wurde mit pMI45 bezeichnet.

Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Pst*I erhalten. Das Fragment wurde in pBluscript II SK+ (Genbank Acc.: X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

10 Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Xho*I aus pMI46 herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

15 Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Afl*II/*Not*I aus pMI43 herausgeschnitten und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen  
20 Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Not*I und *Nar*I aus dem Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis identifizierten OK1 Proteins.

25

#### **11. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt**

Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die  
30 Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der



Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56).  
5 Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

## 10 12. Herstellung transgener Maispflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen

- a) Herstellung eines Konstruktes zur Transformation von Maispflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

Als Ausgangsplasmid zur Herstellung eines Plasmides, welches zur Transformation  
15 von Maispflanzen verwendet wurde, diente das Plasmid pMZ12. Dieses Plasmid enthält den *ColE1* Origin des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., 1977, Gene 2, 95-113) und einen bakteriellen Selektionsmarker, der eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Gentamycin vermittelt (Wohlleben et al., 1989, MGG 217, 202-208). Weiterhin enthält dieses Plasmid eine rechte und eine linke T-DNA Border Sequenz.  
20 Zwischen diesen T-DNA Border Sequenzen enthält das Plasmid ein *bar* Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (White et al., 1990, NAR 18, 1062; EMBL Acc.: X17220), welches Resistenz gegenüber dem Herbizid Glufosinat vermittelt. Die Expression des *bar* Gens wird durch den Promotor des *actin* gens aus Reis (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2, 163.171) initiiert. Zur Stabilisierung der Expression des *bar*  
25 Gens ist zwischen dem *actin* Promotor und der das *bar* Protein codierenden Sequenz das 1. Intron des *actin* Gens aus Reis (McElroy et al., 1990, Plant Cell 2, 163.171) eingefügt. Nach der das *bar* Protein codierenden Sequenz folgt das Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J Mol. Appl. Gent. 1, 561-573).  
30 In das Plasmid pMZ12 wurde der Ubiquitinpromotor aus *Zae mays* (Christensen et al. 1992, Plant Mol. Bio 18, 675-689), gefolgt vom 1. Intron des Ubiquitin Gens aus *Zea mays* (Christensen et al. 1992, Plant Mol. Bio 18, 675-689), gefolgt von der

codierenden Sequenz des R1 Gens aus *Solanum tuberosum* (siehe SEQ ID NO 10), gefolgt von dem Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, J Mol. Appl. Gent. 1, 561-573) zwischen die linke und rechte T-DNA Border Sequenz eingefügt. Das erhaltene  
5 Plasmid wurde mit pHN3-146 bezeichnet.

b) Transformation von Maispflanzen mit dem Plasmid pHN3-146

Zehn Tage nach Pollination wurden unreife Embryonen von Maispflanzen isoliert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid pHN3-146 als  
10 Cointegrat, nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert. Aus dieser Transformation hervorgegangene so genannte T0 Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen.

c) Identifizierung von Maispflanzen, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1  
15 Proteins aus *Solanum tuberosum* aufweisen

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das S.t.-R1 Protein, aufwiesen.

d) Herstellung des Plasmides pUbi-A.t.-OK1

20 Zunächst wurde das Plasmid pIR96 hergestellt. Das Plasmid pIR96 wurde erhalten, indem ein synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT  
ATCATTTAC) und X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT  
25 CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten und die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein  
30 Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion  
5 des Carbenicillin Resistenzgens, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des Pseudomonas-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das  
10 selektierbare Markergen aadA, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären bar-Gens  
15 zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre bar-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987, EMBO J. 6, 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription  
20 und Polyadenylierung. Das bar-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (EMBLK Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) wurde als *Pst*I-Fragment in pBluescript II SK+ kloniert. Das erhaltene  
25 Plasmid wurde mit pSK-ubq bezeichnet.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM wurde mit dem Restriktionsenzymen *Bsp*120I geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sac*I nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in das Plasmid pSK-ubq kloniert, welches mit *Sma*I und *Sac*I  
30 gschnitten war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq-ok1 bezeichnet.

Aus dem Plasmid pSK-ubq-ok1 wurde ein Fragment isoliert, welches den Ubiquitin-Promoter aus Mais und das vollständige offene Leseraster für das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* enthielt. Dazu wurde das Plasmid mit dem

Restriktionsenzym *Asp718I* geschnitten, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und mit *SdaI* nachgeschnitten. Das erhaltene, 5799 Basenpaare große Fragment wurde in das mit *EcoRV* und *PstI* geschnittene Plasmid pIR96 kloniert. Das aus dieser Klonierung erhaltene Plasmid wurde mit pUbi-A.t.-OK1 bezeichnet.

5

e) Transformation von Maispflanzen mit dem Plasmid pUbi-A.t.-OK1

Zehn Tage nach Pollination wurden unreife Embryonen von Maispflanzen isoliert und mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid pUbi-A.t.-OK1 als Cointegrat, nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert. Aus dieser Transformation hervorgegangene so genannte T0 Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen.

10

f) Identifizierung von Maispflanzen, die eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* aufweisen

15 Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein, aufwiesen.

g) Erzeugung von homozygoten Pflanzen, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins oder des A.t.-OK1 Proteins aufweisen

20 T1 Pflanzen, die eine Expression des S.t.-R1 Proteins oder des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, wurden Samen der einzelnen Pflanzen geerntet und jeweils ca. 30 Samen pro Pflanze erneut ausgelegt und im Gewächshaus kultiviert. Pflanzen dieser T1 Generation wurden im Dreiblattstadium mit einer Lösung, enthaltend 0,5% Basta® besprüht. Es wurden nur solche Gruppen von T1 Pflanzen weiterverfolgt, bei  
25 welchen ca. 25% der jeweils 30 kultivierten Pflanzen nach Sprühen mit der Basta® Lösung abstarben, da es sich bei diesen Pflanzen um solche handelt, bei welchen die Integration der betreffenden T-DNA des Plasmides pHN3-146 oder pUbi-A.t.-OK1 an einem Locus im Genom vorliegt. Aus Blattmaterial von den ca. 75% der Pflanzen, die das Sprühen mit Basta® Lösung überlebten, wurde jeweils genomische DNA  
30 isoliert und mittels Invader® Technology (Pielberg et al. 2003, Genome Res.;13, 2171-2177) auf die jeweils vorliegende Kopienzahl hin untersucht. Bei T1 Pflanzen, die innerhalb einer Gruppe von Nachkommen einer T0 Pflanze, bei der Analyse mittels Invader® Technologie ein etwa doppelt so starkes Signal ergaben, wie die

restlichen Nachkommen der gleichen T0 Pflanze, sind homozygot bezüglich des Locus, an welchem die T-DNA des betreffenden Plasmides integriert ist. Weisen ca. 30% der Nachkommen einer T0 Pflanze, die die Behandlung mit Basta® Lösung überlebt haben ein etwa doppelt so starkes Signal in der Analyse mittels Invader® Technologie auf, im Vergleich zu den restlichen ca.70% der Nachkommen der gleichen T0 Pflanze, so ist dieses ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich um die Integration der T-DNA an einem einzigen Locus handelt.

- h) Erzeugung von Pflanzen, die sowohl eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins, als auch eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufweisen
- T1 Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines S.t.-R1 Proteins aufwiesen und die nach der unter g) beschriebenen Analyse homozygot bezüglich der Integration der T-DNA des Plasmides pHN3-146 sind und in welchen die Integration an einem Locus im Genom der Pflanze vorliegt, wurden mit T1 Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufwiesen und nach der unter g) beschriebenen Analyse homozygot bezüglich der Integration der T-DNA des Plasmides pUbi-A.t.-OK1 sind und in welchen die Integration an einem Locus im Genom der Pflanze vorliegt, gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen weisen sowohl eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins, als auch eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins auf.

- i) Analyse der Körner von transgenen Maispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus den unter h) beschriebenen Kreuzungen hervorgegangenen Körnern der betreffenden Mais Pflanzen wurde Stärke isoliert. Die Stärke aus Körnern, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins und eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, enthielt mehr kovalent an die Stärke gebundenes Phosphat, als Stärke, isoliert aus nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen.

Stärke, isoliert aus Körnern, die eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins und eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen, enthielt ebenfalls mehr kovalent an die Stärke gebundenes Phosphat, als Stärke, isoliert aus Pflanzen, die nur eine erhöhte Expression des S.t.-R1 Proteins oder nur eine erhöhte Expression des A.t.-OK1 Proteins aufwiesen.

**13. Herstellung transgener Weizenpflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen**

a) Herstellung von transgenen Weizenpflanzen, die ein R1 Protein  
5 überexprimieren

Die Herstellung von Weizenpflanzen, welche eine erhöhte Expression des R1 Proteins von Kartoffel aufweisen, wurde in WO 02 34923 beschrieben. Die dort beschriebenen Pflanzen wurden teilweise als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Pflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins  
10 aufweisen, eingesetzt.

b) Herstellung eines Plasmides zur Transformation von Weizenpflanzen, die ein OK1 Protein überexprimieren

pMCS5 (Mobitec, [www.mobitec.de](http://www.mobitec.de)) wurde mit *BglII* und *BamHI* verdaut und religiert.  
15 Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4 bezeichnet.

Der *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573) wurde mit den Primern P9 (ACTTCTgCAgCggCCgCgATCgTTCAAACATTTggCAATAAAgTTTC) und P10 (TCTAAgCTTggCgCCgCTAgCAgATCTgATCTAgTAACATAgATgACACC)

20 amplifiziert (25 Zyklen, 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 30 sec 72 °C), mit *HindIII* und *PstI* verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pML4 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4-nos bezeichnet. In diesen Vektor wurde ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (Genbank Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant  
25 Mol. Biol. 18: 675-689) und dem durch Verdau mit *ClaI* und Religation verkürzten ersten Intron desselben Gens kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML8 bezeichnet.

In das Plasmid pML8 wurde das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Dazu wurde das entsprechende Fragment mit  
30 *Bsp120/NotI* aus A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in sense Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pML8 ligiert.

Aus dem erhaltenen Vektor pML8-A.t.-OK1 kann mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* ein Fragment für die Transformation von Weizenpflanzen herausgeschnitten werden, welches den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den nos-  
5 Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält.

c) Herstellung eines Plasmides zur Erzeugung von Weizenpflanzen, die ein R1 Protein überexprimieren

Es wurde ein Plasmid hergestellt indem das DNA-Fragment welches für das  
10 vollständige R1-Protein aus Kartoffel codiert, zwischen zwei Erkennungsschnittstellen für das Restriktionsenzym *PacI* liegt. Dazu wurde die *Multiple Cloning Site* aus dem Plasmid pBluescript II SK+ mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion und den beiden Oligonukleotiden MCS1-1 (TTTTTGCGCGCGTTAATTAACGACTCACTATAGGGCGA) und MCS1-2  
15 (TTTTTGCGCGCTTAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAG) amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym *BssHII* nachgeschnitten und in den mit *BssHII* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pBluescript II SK+ (Invitrogen) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-Pac bezeichnet.

In den Vektor pSK-Pac wurde ein *NotI*-Fragment kloniert, welches aus dem Klon  
20 pRL2 (WO 9711188) erhalten wurde. Das *NotI* Fragment enthält das vollständige offene Leseraster für das R1-Protein aus Kartoffel. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR1 bezeichnet.

Aus pSK-ubq (siehe oben) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *SmaI* ein  
25 Fragment herausgeschnitten, welches den Ubiquitin-Promoter und das verkürzte erste Intron enthielt und in die *EcoRV*-Schnittstelle des Plasmids pIR96 kloniert. In das erhaltene Plasmid wurde in sense Orientierung zum Promoter ein *PacI*-Fragment aus pIR1 kloniert, welches das vollständige offene Leseraster kodierend für das R1-Protein aus Kartoffel enthält. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML82 bezeichnet.

30 d) Transformation von Weizenpflanzen zur Überexpression von einem OK1 Protein

Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit aus einem Agarosegel ausgeschnittenen Fragment, welches mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI*

aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, zusammen mit dem Plasmid pGSV71 mittels der biolistischen Methode nach  
5 der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-OK1 bezeichnet.

e) Transformation von Weizenpflanzen zur Überexpression von einem R1 Protein  
Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit dem Plasmid pML82 mittels der  
10 biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-R1 bezeichnet.

f) Cotransformation von Weizenpflanzen zur Überexpression eines OK1 Proteins  
15 und eines R1 Proteins  
Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit einem DNA Gemisch, enthaltend das Plasmid pML82 und ein mittels HPLC gereinigtes Fragment, welches mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das  
20 vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, mittels der biolistischen Methode nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert. Mit Hilfe von RT-PCR wurden Pflanzen identifiziert, die sowohl eine Expression des A.t.-Ok1 Proteins, als auch eine Expression des S.t.-R1 Proteins  
25 aufwiesen. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit TA-R1-OK1 bezeichnet.

g) Identifizierung von transgenen Weizenpflanzen  
T1 Pflanzen der Linien TA-R1 und TA-OK1 wurden im Gewächshaus kultiviert und vor der Blüte mit Basta® (0,5%ige Lösung) besprüht. Pflanzen, die das Basta®  
30 vermittelnde Resistenzgen nicht exprimieren starben ab.

h) Herstellung von Weizenpflanzen, die eine Expression eines S.t.-R1 Proteins und eine Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufweisen, mittels Kreuzung



TA-OK1 Pflanzen, die die Behandlung mit Basta® überlebten, wurden entweder mit TA-R1 Pflanzen, die die Behandlung mit Basta® überlebten oder mit homozygoten Pflanzen der in WO 02 034923 beschriebenen Linie 40A-11-8 gekreuzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit TA-Ok1xTA-R1 bzw. mit TA-OK1x40A-11-8 bezeichnet.

e) Analyse der transgenen Weizenpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus durch Kreuzungen der Linien TA-Ok1 und TA-R1 bzw. TA-OK1 und 40A-11-8 hervorgegangenen Körnern wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt von Stärke, die aus Körnern, entstanden aus den Kreuzungen TA-Ok1 und TA-R1 bzw. TA-OK1 und 40A-11-8 isoliert wurde, war bei einigen Pflanzen deutlich höher, als bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen oder aus Pflanzen der Linie 40A-11-8 isoliert wurde.

Für die Analyse der Stärke aus verschiedenen TA-R1-OK1 Linien wurden Körner der jeweiligen Pflanzen geerntet und der C-6-Phosphatgehalt und der C-3-Phosphatgehalt der isolierten Stärke analysiert. Es konnten einige Pflanzen identifiziert werden, bei welchen der Gehalt an C-6-Phosphat plus C-3-Phosphat deutlich erhöht war im Vergleich zu dem Gehalt an C-6-Phosphat plus C-3-Phosphat von Stärke, isoliert aus Körnern der Linien TA-R1 oder 40A-11-8.

**14. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine erhöhte Expression eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins aufweisen**

a) Herstellung des Plasmides pGlo-A.t.-OK1

Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C, 4 mM Mg2SO4) mit den Primern glb1-F2 (AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und glb1-R1 (AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer

11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend

aus den beiden Oligonukleotiden X1

5 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT  
ATCATTTAC) und X2

(AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT  
CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde.

- 10 Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-  
Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4  
DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und  
Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des  
Octopinsynthese Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene  
15 Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

Das Plasmid pIR103 wurde erhalten, indem ein 986 Basenpaare langes DNA  
Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert  
in das Plasmid pIR96 kloniert wurde.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären

- 20 Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen  
Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989),  
19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion  
des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-  
Region des Plasmides pTiB6S3.

- 25 pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al.,  
Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-  
Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das  
selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella*  
*pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und  
30 Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and  
Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens  
zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die

Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein DNA-Fragment, welches die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters des OK1 Proteins aus *Arabidopsis* enthält, wurde aus dem Vektor A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in den Vektor pIR103 kloniert. Dazu wurde das Plasmid A.t.-OK1-pGEM mit dem Restriktionsenzymen *Bsp120I* geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sall* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in den mit *Ecl136II* und *XhoI* geschnittenen Vektor pIR103 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pGlo-A.t.-OK1 bezeichnet.

15

b) Transformation von Reispflanzen mit dem Plasmid pGlo-A.t.-OK1

Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plasmid pGlo-A.t.-OK1) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

20

c) Analyse der transgenen Reispflanzen, die mit dem Plasmid pGlo-A.t.-OK1 transformiert wurden

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein, aufwiesen. Homozygote Pflanzen der T1 Generation wurden wie oben in Beispiel 11. g) anhand von Maispflanzen beschrieben, identifiziert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit OS-OK1 bezeichnet.

25

d) Transformation von Reispflanzen mit dem Plasmid pML82

30 Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plasmid pML82) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

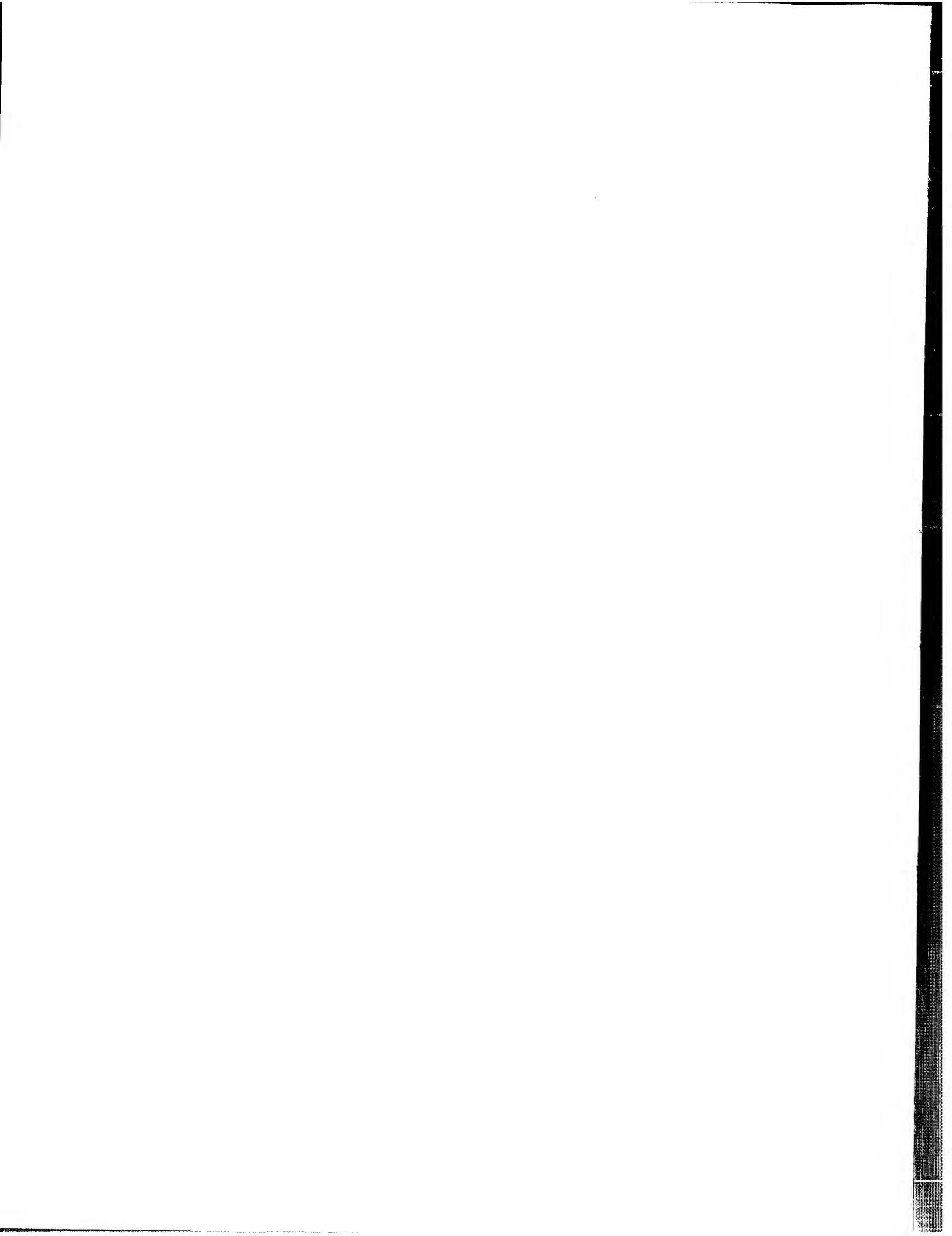
- e) Analyse der transgenen Reispflanzen, die mit dem Plasmid pGloML82 transformiert wurden

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das S.t.-R1 Protein, aufwiesen. Homozygote Pflanzen der T1 Generation wurden wie oben in Beispiel 11. g) anhand von Maispflanzen beschrieben, identifiziert. Die erhaltenen Pflanzen wurden mit OS-R1 bezeichnet.

- f) Herstellung von Reispflanzen, die eine Expression eines S.t.-R1 Proteins und eine Expression eines A.t.-OK1 Proteins aufweisen, mittels Kreuzung.

Homozygote OS-OK1 Pflanzen wurden entweder mit homozygoten OS-R1 Pflanzen, gekreuzt. Die erhaltenen Nachkommen wurden mit OS-Ok1xOS-R1 bezeichnet.

- g) Analyse der transgenen Reispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke
- Aus den durch Kreuzungen hervorgegangenen OS-Ok1xOS-R1 Körnern wurde Stärke isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke, die aus Körnern, entstanden aus den Kreuzungen der Linien OS-Ok1 und OS-R1 isoliert wurde, war bei einigen Linien deutlich höher, als bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen oder aus Pflanzen der Linien OS-R1 isoliert wurde.



## Patentansprüche

1. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins und mindestens eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
2. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls, in das Genom der Pflanze besteht.
3. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
4. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert.
5. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei ein erstes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert und ein zweites fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
6. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 4 oder 5, wobei besagtes fremdes, ein R1 Protein codierendes, Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein aus Kartoffel, Weizen, Mais, Reis, Soyabohne, Citrus oder *Arabidopsis* codiert.
7. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, die eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
8. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 7, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweist, im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.
9. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 8, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.

10. Pflanze enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Pflanze nach Anspruch 10, die eine Stärke speichernde Pflanze ist.
12. Pflanze nach Anspruch 11, die eine Maispflanze oder Weizenpflanze ist.
13. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
14. Erntebare Pflanzenteile von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
15. Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, worin
  - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins und eines R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
  - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird; und
  - c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15, worin die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle besteht.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei mindestens ein besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ein R1 Protein codiert.
18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei mindestens ein besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, worin die genetisch modifizierte Pflanze im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisiert.

20. Verfahren nach Anspruch 19, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat aufweist.
21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, worin die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.
22. Modifizierte Stärke erhältlich aus einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 14.
23. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer genetisch modifizierten Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
24. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12,.
25. Verwendung von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Herstellung einer modifizierten Stärke.
26. Modifizierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 23 oder 24.
27. Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin modifizierte Stärke nach Anspruch 22 oder 26 derivatisiert wird.
28. Derivatisierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 27.
29. Verwendung von modifizierter Stärke nach einem der Ansprüche 22 oder 26 zur Herstellung von derivatisierter Stärke.
30. Mehle, enthaltend modifizierte Stärke nach Anspruch 22 oder 26.
31. Mehle, erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, aus Teilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 14.



32. Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von Pflanzenteilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 oder von Vermehrungsmaterial nach Anspruch 13 oder erntebarem Material nach Anspruch 14.
33. Verwendung von genetisch modifizierten Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder von Pflanzen nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Herstellung von Mehlen.
34. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend ein Nucleinsäuremolekül codierend ein OK1 Protein und ein Nucleinsäuremolekül codierend ein R1 Protein.
35. Vektor enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34.
36. Vektor nach Anspruch 35, wobei die rekombinanten Nucleinsäuremoleküle mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren.
37. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 35 oder 36.
38. Zusammensetzung enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 35 oder 36.
39. Zusammensetzung enthaltend eine Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein und eine Nucleinsäuresequenz codierend ein R1 Protein.
40. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 38 oder 39 zur Transformation von Pflanzenzellen.

21-07-2004

**Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins und eines Stärke phosphorylierenden R1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung, Nucleinsäuremoleküle und Vektoren, enthaltend Sequenzen, die für ein OK1 Protein und ein R1 Protein codieren, sowie Wirtszellen, die diese Nucleinsäuremoleküle enthalten.



1 / 6

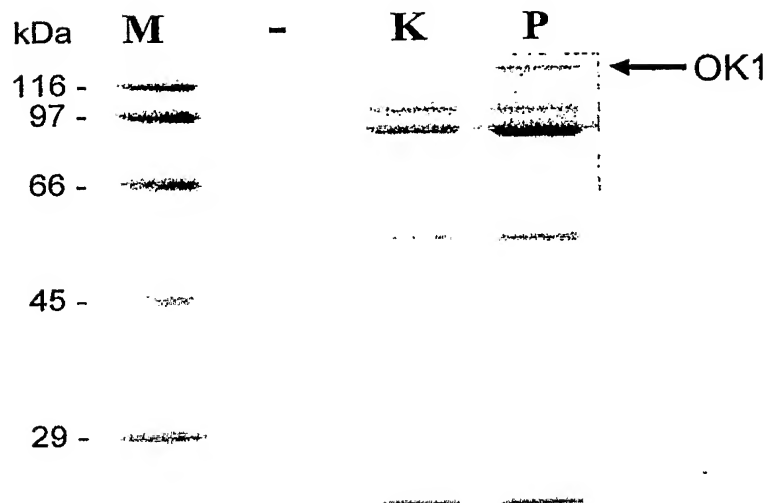


Fig. 1

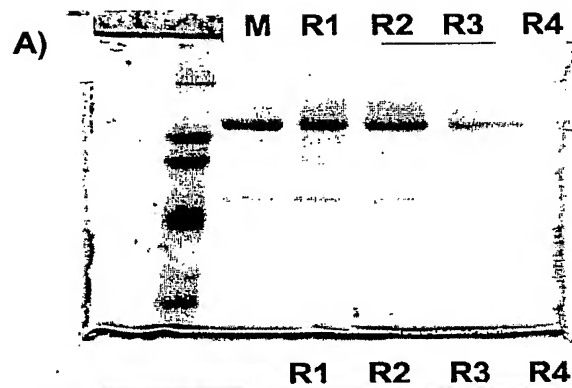


Fig. 2

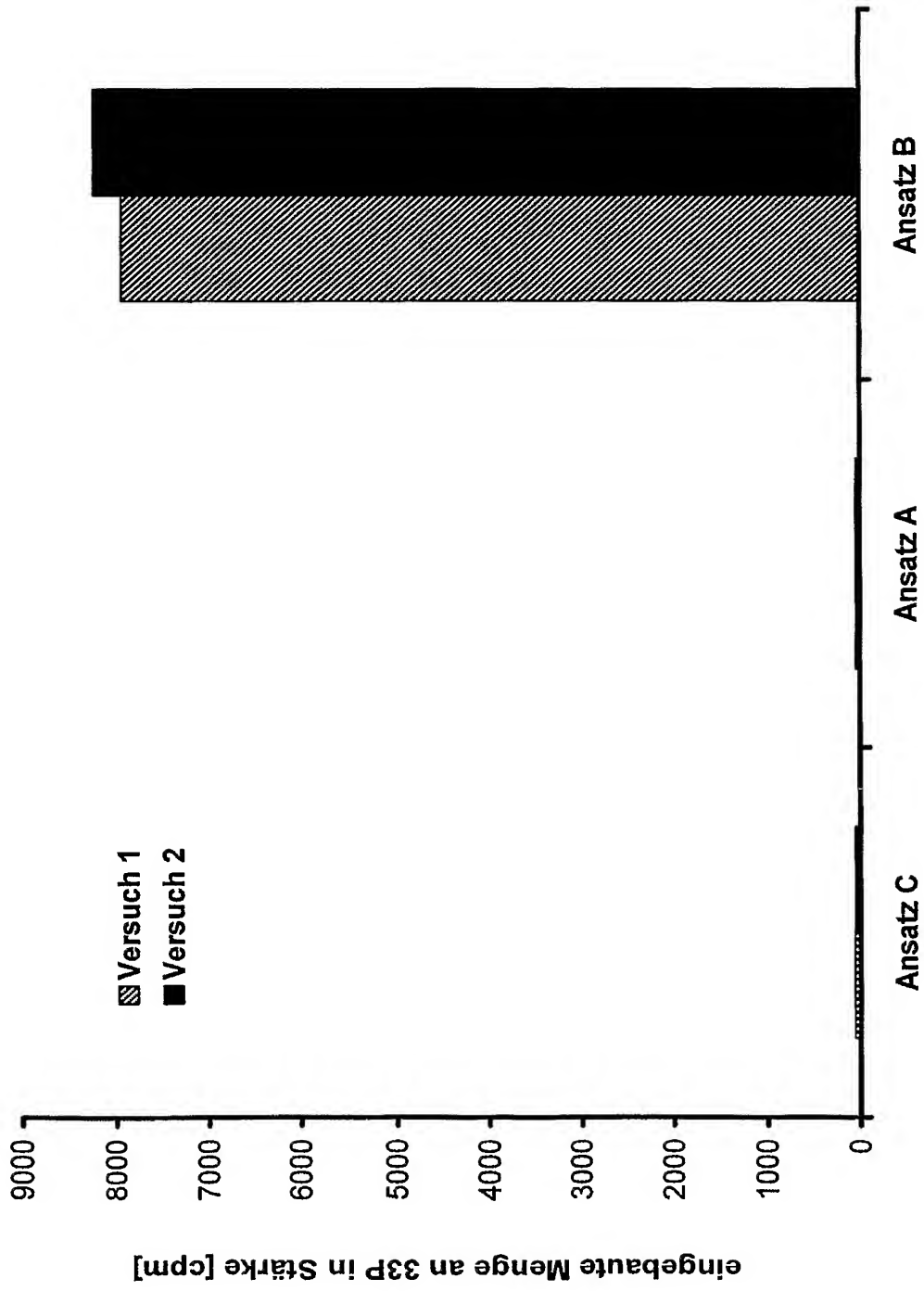


Fig.: 3

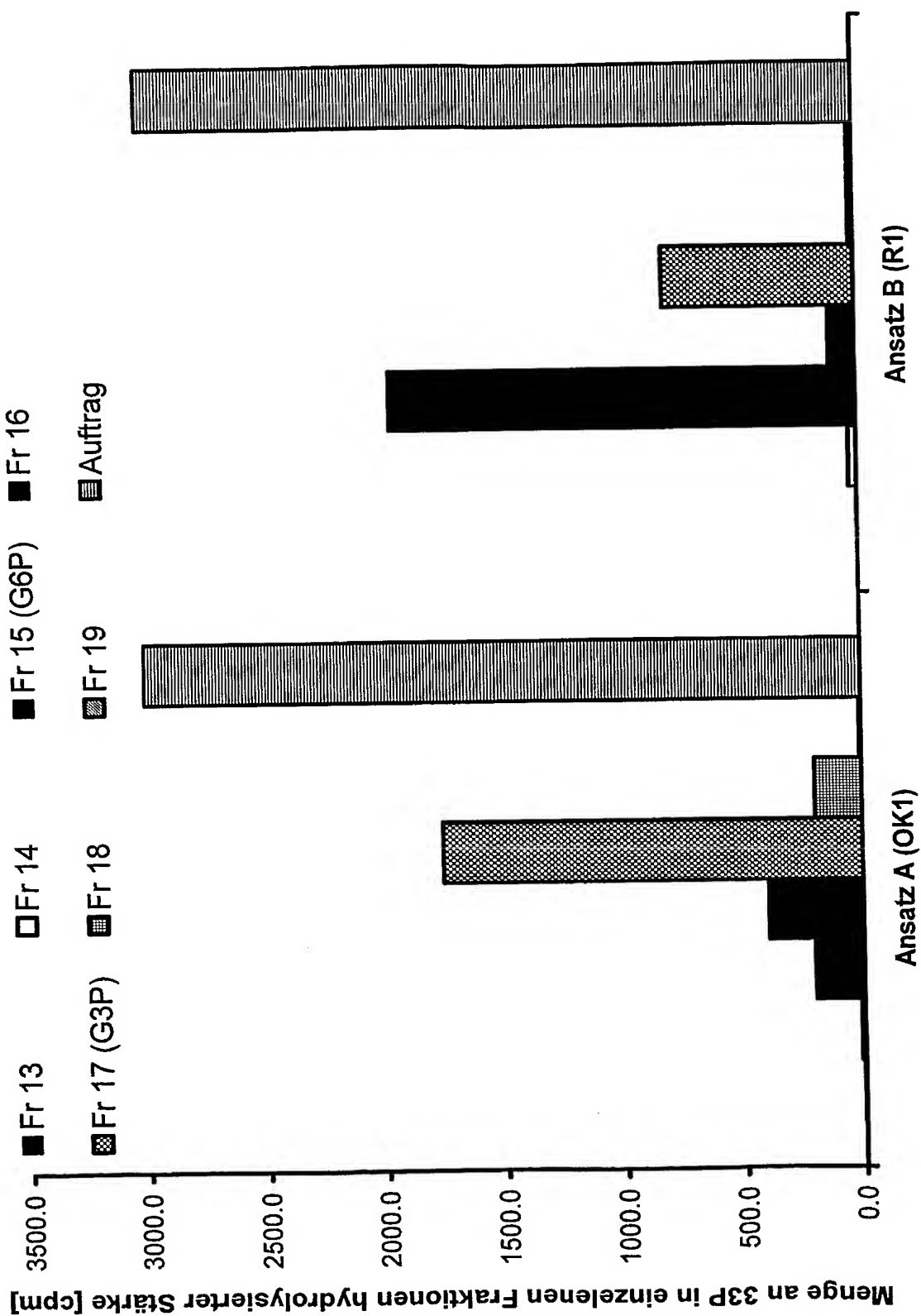


Fig. 4

4 / 6

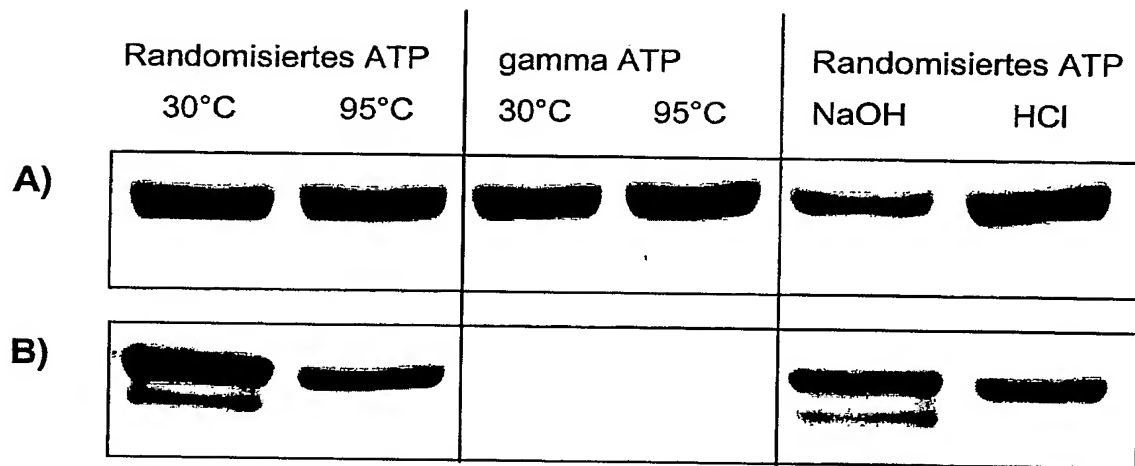


Fig. 5

5 / 6

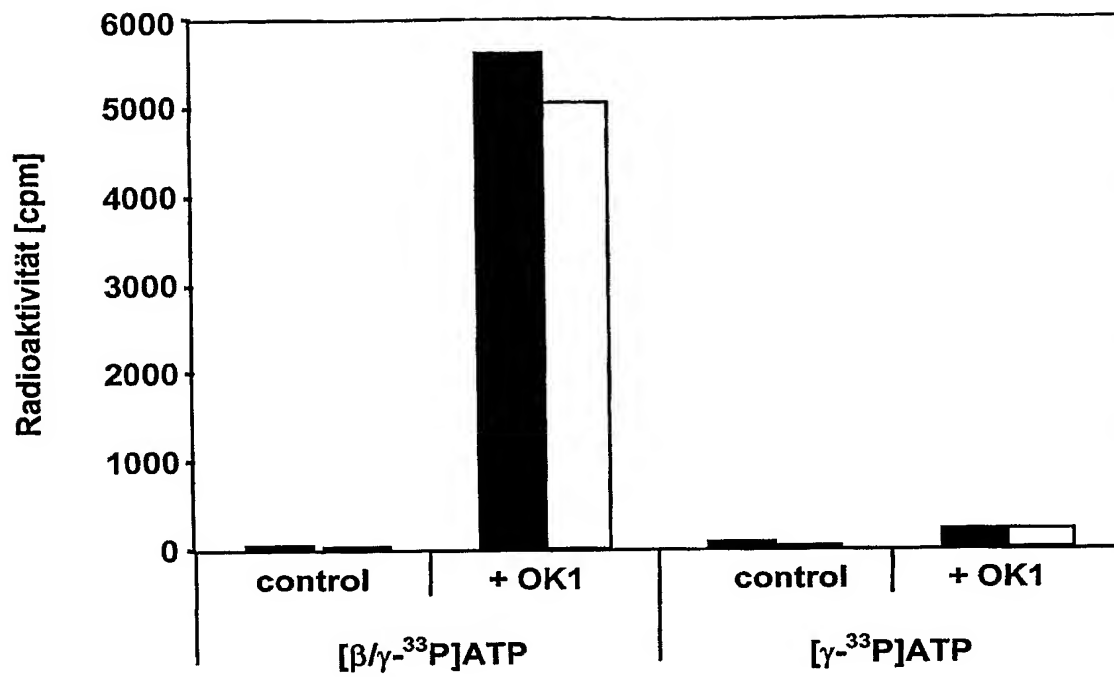


Fig. 6



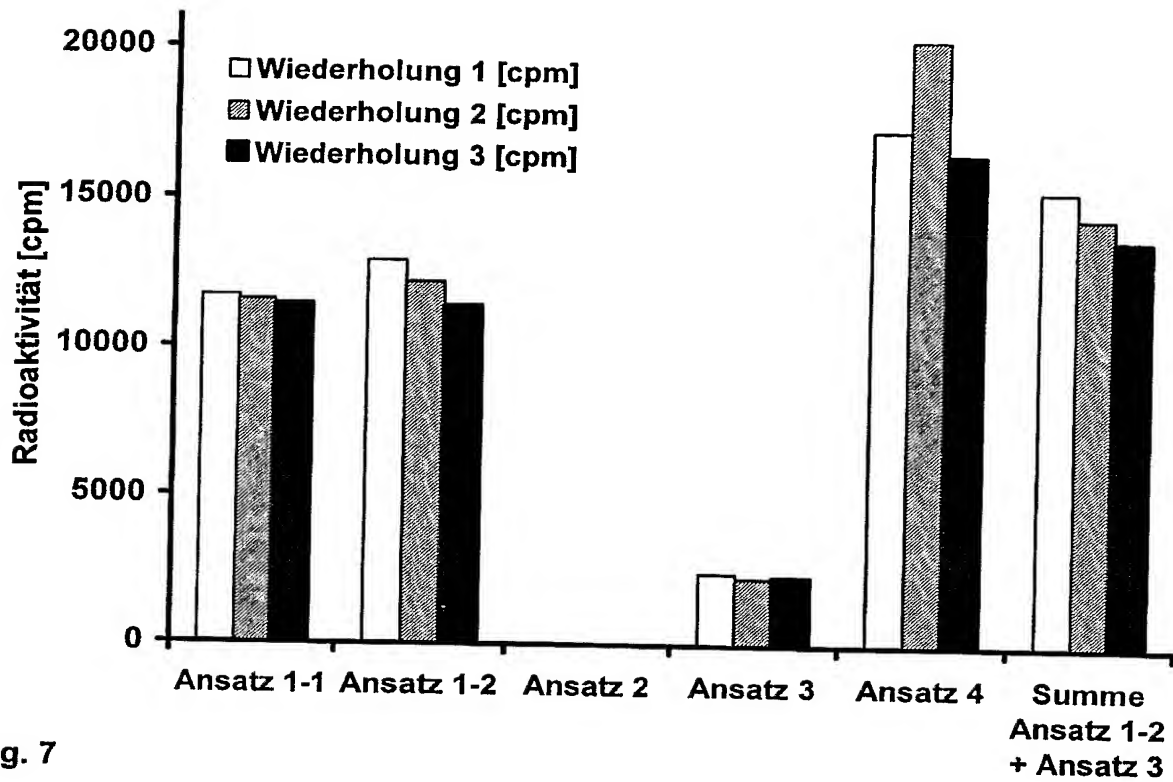


Fig. 7

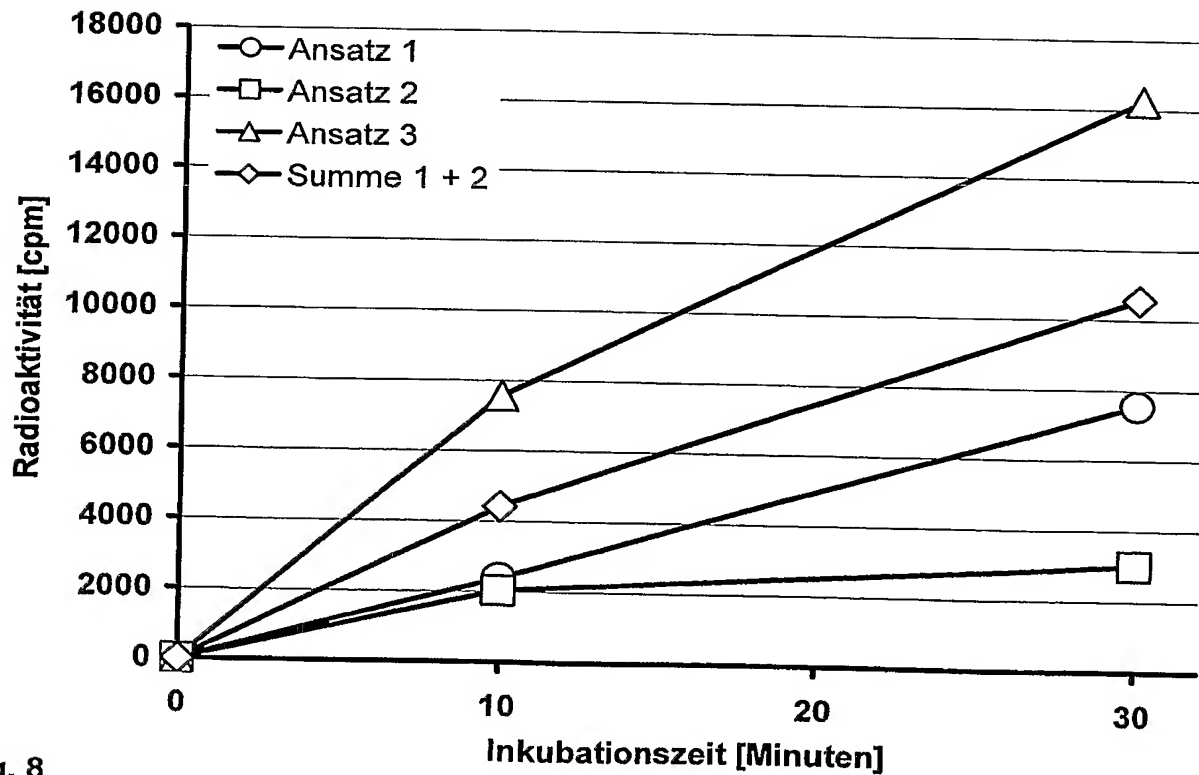


Fig. 8

21-07-2004

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> pflanzen mit erhöhter Aktivität mehrerer stärke phosphorylierender Enzyme

<130> BCS 04-5012-EP

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3591

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

**<220>**

<221> CDS

<222> (1) .. (3591)

<223>

<400> 1  
atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc 48  
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile  
1 5 10 15

act aga aac tca tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac 96  
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His  
25 30

aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct 144  
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser

cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg 192  
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg  
50 55 60

aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta 240  
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu  
65 70 75 80

gat cat caa gtt aat ttt ggt gac cat gtg gct atg ttt gga tca gct 288  
Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala  
85 90 95

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

aaa gag att ggt tca tgg aaa aag aaa tcg cct ttg aat tgg agt gag Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu 100 105 110	336
aat gga tgg gtt tgt gag ttg gaa ctt gac ggt ggt cag gtt ttg gag Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu 115 120 125	384
tat aag ttt gtc att gtt aag aat gat ggt tca ctt tca tgg gaa tct Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser 130 135 140	432
ggt gat aat cgt gtc ctt aag gtt cca aat tct ggg aat ttt tct gtt Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val 145 150 155 160	480
ggt tgt cat tgg gat gct act aga gaa acc ctt gat ttg cct cag gag Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu 165 170 175	528
ggt ggt aat gat gat gat gtt ggt gat ggt ggg cat gag agg gat aat Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn 180 185 190	576
cat gat gtt ggt gat gat aga gta gtg gga agt gaa aat ggt gcg cag His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln 195 200 205	624
ctt cag aag agt aca ttg ggt ggg caa tgg caa ggt aaa gat gcg tcc Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser 210 215 220	672
ttt atg cgt tct aat gat cat ggt aac aga gaa gtt ggt aga aat tgg Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp 225 230 235 240	720
gat act agt ggt ctt gaa ggc aca gct ctt aag atg gtt gag ggt gat Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp 245 250 255	768
cgc aac tct aag aac tgg tgg aga aag ctt gaa atg gta cgc gag gtt Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val 260 265 270	816
ata gtt ggg agt gtt gag agg gag gaa cga ttg aag gcg ctc ata tac Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr 275 280 285	864
tct gca att tat ttg aag tgg ata aac aca ggt cag att cct tgt ttt Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe 290 295 300	912
gaa gat gga ggg cat cac cgt cca aac agg cat gcc gag att tcc aga Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg 305 310 315 320	960
ctt ata ttc cgt gag ttg gag cac att tgc agt aag aaa gat gct act Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr 325 330 335	1008
cca gag gaa gtg ctt gtt gct cgg aaa atc cat ccg tgt tta cct tct Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser 340 345 350	1056
ttc aaa gca gag ttt act gca gct gtc cct cta act cgg att agg gac Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp 355 360 365	1104

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ata gcc cat cgg aat gat att cct cat gat ctc aag caa gaa atc aag Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys 370 375 380	1152
cat acg ata caa aat aag ctt cac cgg aat gct ggt cca gaa gat cta His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu 385 390 395 400	1200
att gca aca gaa gca atg ctt caa cga att acc gag acc cca gga aaa Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys 405 410 415	1248
tat agt gga gac ttt gtg gag cag ttt aaa ata ttc cat aat gag ctt Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu 420 425 430	1296
aaa gat ttc ttt aat gct gga agt ctc act gaa cag ctt gat tct atg Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met 435 440 445	1344
aaa att tct atg gat gat aga ggt ctt tct gcg ctc aat ttg ttt ttt Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe 450 455 460	1392
gaa tgt aaa aag cgc ctt gac aca tca gga gaa tca agc aat gtt ttg Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu 465 470 475 480	1440
gag ttg att aaa acc atg cat tct cta gct tct tta aga gaa aca att Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile 485 490 495	1488
ata aag gaa ctt aat agc ggc ttg cga aat gat gct cct gat act gcc Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala 500 505 510	1536
att gca atg cgc cag aag tgg cgc ctt tgt gag atc ggc ctc gag gac Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp 515 520 525	1584
tac ttt ttt gtt cta cta agc aga ttc ctc aat gct ctt gaa act atg Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met 530 535 540	1632
gga gga gct gat caa ctg gca aaa gat gtg gga tca aga aac gtt gcc Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala 545 550 555 560	1680
tca tgg aat gat cca cta gat gct ttg gtg ttg ggt gtt cac caa gta Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val 565 570 575	1728
ggt cta tct ggt tgg aag caa gaa gaa tgt tta gcc att gga aat gaa Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu 580 585 590	1776
ctc ctt gct tgg cga gaa agg gac cta ctt gaa aaa gaa ggg gaa gag Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu 595 600 605	1824
gat gga aaa aca att tgg gcc atg agg ctg aaa gca act ctt gat cga Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg 610 615 620	1872
gca cgc aga tta aca gca gaa tat tct gat ttg ctt ctt caa ata ttt Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe 625 630 635 640	1920

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cct cct aat gtg gag att tta gga aaa gct cta gga att cca gag aat Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn 645 650 655	1968
agt gtc aag acc tat aca gaa gca gag att cgt gct gga att att ttc Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe 660 665 670	2016
cag atc tca aag ctc tgc act gtt ctt cta aaa gct gta aga aat tca Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser 675 680 685	2064
ctt ggt tct gag ggc tgg gat gtc gtt gta cct gga tcg acg tct ggg Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly 690 695 700	2112
aca tta gtt cag gtt gag agc att gtt ccg gga tca ttg cca gca act Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr 705 710 715 720	2160
tct ggt ggt cct att att ctc ttg gtc aat aaa gct gat ggc gat gaa Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu 725 730 735	2208
gag gta agt gct gct aat ggg aac ata gct gga gtc atg ctt ctg cag Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln 740 745 750	2256
gag ctg cct cac ttg tct cac ctt ggc gtt aga gcg cgg cag gag aaa Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys 755 760 765	2304
att gtc ttt gtg aca tgt gat gat gat gac aag gtt gct gat ata cga Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg 770 775 780	2352
cga ctt gtg gga aaa ttt gtg agg ttg gaa gca tct cca agt cat gtg Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val 785 790 795 800	2400
aat ctg ata ctt tca act gag ggt agg agt cgc act tcc aaa tcc agt Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser 805 810 815	2448
gcg acc aaa aaa acg gat aag aac agc tta tct aag aaa aaa aca gat Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp 820 825 830	2496
aag aag agc tta tct atc gat gat gaa gaa tca aag cct ggt tcc tca Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser 835 840 845	2544
tct tcc aat agc ctc ctt tac tct tcc aag gat atc cct agt gga gga Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly 850 855 860	2592
atc ata gca ctt gct gat gca gat gta cca act tct ggt tca aaa tct Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser 865 870 875 880	2640
gct gca tgt ggt ctt ctt gca tct tta gca gaa gcc tct agt aaa gtg Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val 885 890 895	2688
cac agc gaa cac gga gtt ccg gca tca ttt aag gtt cca act gga gtt His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val 900 905 910	2736

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtc	ata	cct	ttt	gga	tcg	atg	gaa	tta	gct	tta	aag	caa	aat	aat	tcg	2784
Val	Ile	Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Leu	Ala	Leu	Lys	Gln	Asn	Asn	Ser	
		915					920					925				
gaa	gaa	aag	ttt	gcg	tct	ttg	cta	gaa	aaa	cta	gaa	acc	gcc	aga	cct	2832
Glu	Glu	Lys	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Thr	Ala	Arg	Pro	
	930					935					940					
gag	ggt	ggt	gag	cta	gac	gac	ata	tgt	gac	cag	atc	cat	gaa	gtg	atg	2880
Glu	Gly	Gly	Glu	Leu	Asp	Asp	Ile	Cys	Asp	Gln	Ile	His	Glu	Val	Met	
945					950					955					960	
aaa	acg	ttg	caa	gtg	cct	aaa	gaa	aca	atc	aac	agc	ata	agc	aaa	gcg	2928
Lys	Thr	Leu	Gln	Val	Pro	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	
				965					970					975		
ttt	ctc	aaa	gat	gct	cgt	ctc	att	gtt	cgt	tca	agt	gct	aac	gtc	gag	2976
Phe	Leu	Lys	Asp	Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	
			980					985						990		
gac	tta	gcc	gga	atg	tca	gct	gca	gga	ctc	tat	gaa	tca	atc	cct	aac	3024
Asp	Leu	Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Asn	
		995					1000					1005				
gtg	agt	ccc	tcg	gat	cct	ttg	gtg	ttt	tca	gat	tcg	gtt	tgc	caa		3069
Val	Ser	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Gln		
	1010					1015					1020					
gtt	tgg	gct	tct	ctc	tac	aca	aga	aga	gct	gtt	cta	agc	cgt	aga		3114
Val	Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Arg		
	1025					1030					1035					
gct	gct	ggg	gtc	tct	caa	aga	gaa	gct	tca	atg	gct	gtt	ctc	gtt		3159
Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val		
	1040					1045					1050					
caa	gaa	atg	ctt	tcg	ccg	gac	tta	tca	ttc	gtt	ctg	cac	aca	gtg		3204
Gln	Glu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	His	Thr	Val		
	1055					1060					1065					
agt	cca	gct	gat	ccg	gac	agt	aac	ctt	gtg	gaa	gcc	gag	atc	gct		3249
Ser	Pro	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Ile	Ala		
	1070					1075					1080					
cct	ggt	tta	ggt	gag	act	tta	gct	tca	gga	aca	aga	gga	aca	cca		3294
Pro	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Gly	Thr	Pro		
	1085					1090					1095					
tgg	aga	ctc	gct	tcg	ggt	aag	ctc	gac	ggg	att	gta	caa	acc	tta		3339
Trp	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile	Val	Gln	Thr	Leu		
	1100					1105					1110					
gct	ttc	gca	aac	ttc	agc	gaa	gag	ctt	ctt	gtg	tca	gga	aca	ggt		3384
Ala	Phe	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Gly		
	1115					1120					1125					
cct	gct	gat	gga	aaa	tac	gtt	cgg	ttg	acc	gtg	gac	tat	agc	aaa		3429
Pro	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Lys		
	1130					1135					1140					
aaa	cgt	tta	act	gtt	gac	tcg	gtg	ttt	aga	cag	cag	ctc	ggt	cag		3474
Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Arg	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln		
	1145					1150					1155					
aga	ctc	ggt	tcg	gtt	ggt	ttc	ttc	ttg	gaa	aga	aac	ttt	ggc	tgt		3519
Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Gly	Phe	Phe	Leu	Glu	Arg	Asn	Phe	Gly	Cys		
	1160					1165					1170					

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gct caa gac gtt gaa ggt tgt ttg gtt ggt gaa gat gtt tac att 3564  
Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile  
1175 1180 1185

gtt cag tca agg cca caa cct ctg tag 3591  
Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu  
1190 1195

<210> 2

<211> 1196

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile  
1 5 10 15

Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His  
20 25 30

Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser  
35 40 45

Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg  
50 55 60

Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu  
65 70 75 80

Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala  
85 90 95

Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu  
100 105 110

Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu  
115 120 125

Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser  
130 135 140

Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val  
145 150 155 160

Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu  
165 170 175

Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn  
180 185 190

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln  
195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser  
210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp  
225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp  
245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val  
260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr  
275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe  
290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg  
305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr  
325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser  
340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp  
355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys  
370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu  
385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys  
405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu  
420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met  
435 440 445

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe  
450 455 460



Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu  
 465 470 475 480  
 Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile  
 485 490 495  
 Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala  
 500 505 510  
 Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp  
 515 520 525  
 Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met  
 530 535 540  
 Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala  
 545 550 555 560  
 Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val  
 565 570 575  
 Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu  
 580 585 590  
 Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu  
 595 600 605  
 Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg  
 610 615 620  
 Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe  
 625 630 635 640  
 Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn  
 645 650 655  
 Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe  
 660 665 670  
 Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser  
 675 680 685  
 Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly  
 690 695 700  
 Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr  
 705 710 715 720  
 Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu  
 725 730 735

Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln  
                     740                                    745                                    750  
 Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys  
                     755                                    760                                    765  
 Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg  
                     770                                    775                                    780  
 Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val  
                     785                                    790                                    795                                    800  
 Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser  
                                     805                                    810  
 Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp  
                                     820                                    825                                    830  
 Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser  
                     835                                    840                                    845  
 Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly  
                     850                                    855                                    860  
 Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser  
                     865                                    870                                    875                                    880  
 Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val  
                                     885                                    890                                    895  
 His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val  
                     900                                    905                                    910  
 Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser  
                     915                                    920                                    925  
 Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro  
                     930                                    935                                    940  
 Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met  
                     945                                    950                                    955                                    960  
 Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala  
                                     965                                    970                                    975  
 Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu  
                     980                                    985                                    990  
 Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn  
                     995                                    1000                                    1005

Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln  
1010 1015 1020

Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg  
1025 1030 1035

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val  
1040 1045 1050

Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val  
1055 1060 1065

Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala  
1070 1075 1080

Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro  
1085 1090 1095

Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu  
1100 1105 1110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly  
1115 1120 1125

Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys  
1130 1135 1140

Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln  
1145 1150 1155

Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys  
1160 1165 1170

Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile  
1175 1180 1185

Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu  
1190 1195

<210> 3

<211> 3644

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

&lt;222&gt; (13)..(3633)

&lt;223&gt;

<400> 3  
cgaggaggat ca atg acg tcg ctg cgg ccc ctc gaa acc tcg ctc tcc ata 51  
Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile  
1 5 10

ggc ggc agg ccg cgc cgt ggt ctc gtc ctc ccg ccg ccc gga gtc ggt 99  
Gly Gly Arg Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly  
15 20 25

gcg ggt gtg ctg ctc cgc cgg gga gcg atg gcg ctc cct ggg cgg cgc 147  
Ala Gly Val Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg  
30 35 40 45

ggc ttc gcg tgc cgc ggg aga tcc gcg gcc tcg gcg gca gag aga aca 195  
Gly Phe Ala Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr  
50 55 60

aag gag aaa aag aga aga gat tct tca aag cag cca ttg gtg cat ctc 243  
Lys Glu Lys Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu  
65 70 75

cag gtt tgt cta gag cac cag gtt aag ttt ggt gag cat gta ggc att 291  
Gln Val Cys Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile  
80 85 90

atc ggt tcc aca aag gag ctt ggt tca tgg gag gag cag gtt gaa ctg 339  
Ile Gly Ser Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu  
95 100 105

gaa tgg act aca aat ggt tgg gtc tgc cag ctt aag ctc cct gga gaa 387  
Glu Trp Thr Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu  
110 115 120 125

aca ctt gtg gag ttt aaa ttt gtt ata ttt ttg gtg gga gga aaa gat 435  
Thr Leu Val Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp  
130 135 140

aaa ata tgg gaa gat ggt aat aac cgt gtt gtt gag ctc ccg aag gat 483  
Lys Ile Trp Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp  
145 150 155

ggt aag ttt gat ata gta tgc cac tgg aat aga aca gaa gag cca tta 531  
Gly Lys Phe Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu  
160 165 170

gaa ctt tta gga aca cca aag ttt gag ttg gtc gga gaa gct gaa aag 579  
Glu Leu Leu Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys  
175 180 185

aat act ggc gag gat gct tca gca tct gta act ttt gca cct gaa aaa 627  
Asn Thr Gly Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys  
190 195 200 205

ggt caa gat att tca gtt gtt gag aat ggt gat cca gca cca gag gcc 675  
Val Gln Asp Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala  
210 215 220

gag tca agc aaa ttt ggt ggg caa tgg caa gga agt aaa act gtt ttc 723  
Glu Ser Ser Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe  
225 230 235

atg aga tca aat gag cat ctg aat aag gag gct gat agg atg tgg gat 771

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Met	Arg	Ser	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Lys	Glu	Ala	Asp	Arg	Met	Trp	Asp	
		240					245				250					
aca	act	ggg	ctt	gat	gga	ata	gca	ctg	aaa	ctg	gtg	gag	ggc	gat	aaa	819
Thr	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile	Ala	Leu	Lys	Leu	Val	Glu	Gly	Asp	Lys	
	255					260					265					
gca	tcc	agg	aac	tgg	tgg	cgg	aag	tta	gag	gtt	gtt	cgc	ggg	ata	ttg	867
Ala	Ser	Arg	Asn	Trp	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Val	Val	Arg	Gly	Ile	Leu	
	270				275					280					285	
tca	gaa	tct	ttt	gat	gac	cag	agt	cgt	ctg	ggg	gcc	ctt	gta	tac	tca	915
Ser	Glu	Ser	Phe	Asp	Asp	Gln	Ser	Arg	Leu	Gly	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	
				290					295					300		
gct	att	tat	ctg	aag	tgg	att	tat	aca	ggg	cag	ata	tcg	tgc	ttt	gaa	963
Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Trp	Ile	Tyr	Thr	Gly	Gln	Ile	Ser	Cys	Phe	Glu	
			305					310					315			
gat	ggg	ggc	cac	cat	cgg	cct	aac	aaa	cat	gct	gag	ata	tcg	agg	caa	1011
Asp	Gly	Gly	His	His	Arg	Pro	Asn	Lys	His	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg	Gln	
		320					325					330				
ata	ttc	cgt	gaa	ctt	gaa	atg	atg	tat	tat	ggg	aaa	acc	aca	tca	gcc	1059
Ile	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Met	Met	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Thr	Thr	Ser	Ala	
	335					340					345					
aag	gat	gtt	ctc	gtg	att	cgc	aaa	att	cat	ccc	ttt	tta	cct	tca	ttt	1107
Lys	Asp	Val	Leu	Val	Ile	Arg	Lys	Ile	His	Pro	Phe	Leu	Pro	Ser	Phe	
	350				355					360					365	
aag	tca	gag	ttt	aca	gcc	tct	gtc	cct	cta	aca	cga	att	cgt	gat	att	1155
Lys	Ser	Glu	Phe	Thr	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp	Ile	
				370					375					380		
gct	cac	cgg	aat	gac	atc	cca	cat	gat	ctc	aag	caa	gaa	atc	aag	cat	1203
Ala	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Pro	His	Asp	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Lys	His	
			385					390					395			
act	ata	caa	aac	aaa	ctt	cat	cgt	aat	gct	gga	cct	gag	gat	ctt	att	1251
Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu	Ile	
		400					405					410				
gct	aca	gaa	gtc	atg	ctt	gct	agg	att	act	aag	acc	cct	gga	gaa	tac	1299
Ala	Thr	Glu	Val	Met	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Pro	Gly	Glu	Tyr	
	415					420					425					
agt	gaa	aca	ttt	gtt	gaa	caa	ttc	acg	ata	ttt	tat	agc	gaa	cta	aaa	1347
Ser	Glu	Thr	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ser	Glu	Leu	Lys	
	430				435				440						445	
gat	ttc	ttc	aat	gct	ggc	agc	cta	ttt	gag	caa	ctg	gag	tcc	atc	aag	1395
Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	
				450					455					460		
gaa	tct	ctg	aac	gag	tca	ggc	tta	gaa	gtt	ctc	tca	tcc	ttt	gtg	gaa	1443
Glu	Ser	Leu	Asn	Glu	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Val	Glu	
			465					470					475			
acc	aaa	agg	agt	ttg	gac	caa	gtg	gat	cat	gca	gaa	gat	ttg	gat	aaa	1491
Thr	Lys	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	His	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Lys	
		480					485					490				
aat	gat	acc	att	caa	att	ttg	atg	act	acc	ttg	caa	tca	tta	tct	tct	1539
Asn	Asp	Thr	Ile	Gln	Ile	Leu	Met	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Ser	
	495					500					505					
cta	aga	tcg	gtt	cta	atg	aag	ggc	ctt	gaa	agt	ggc	ctt	aga	aat	gat	1587

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Leu Arg Ser Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp  
 510 515 520 525

gcg cct gat aat gct ata gca atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gaa 1635  
 Ala Pro Asp Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu  
 530 535 540

att agt ctt gag gat tat tca ttt gtt ctg tta agc aga ttc atc aat 1683  
 Ile Ser Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn  
 545 550 555

act ctt gaa gcc tta ggt gga tca gct tca ctt gca aag gat gta gct 1731  
 Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala  
 560 565 570

aga aat act act cta tgg gat act act ctt gat gcc ctt gtc att ggc 1779  
 Arg Asn Thr Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly  
 575 580 585

atc aat caa gtt agc ttt tca ggt tgg aaa aca gat gaa tgt att gcc 1827  
 Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala  
 590 595 600 605

ata ggg aat gag att ctt tcc tgg aag caa aaa ggt cta tct gaa agt 1875  
 Ile Gly Asn Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser  
 610 615 620

gaa ggt tgt gaa gat ggg aaa tat att tgg tca cta aga ctt aaa gct 1923  
 Glu Gly Cys Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala  
 625 630 635

aca ctg gac aga gca cgg aga tta acg gaa gag tac tct gaa gca ctt 1971  
 Thr Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu  
 640 645 650

ctt tct ata ttc cct gaa aaa gta atg gtt att ggg aaa gcc ctt gga 2019  
 Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly  
 655 660 665

ata cca gat aac agt gtg aga act tac aca gag gca gaa att cgt gct 2067  
 Ile Pro Asp Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala  
 670 675 680 685

ggc att gtt ttt cag gta tct aaa cta tgc aca gta ctt cag aaa gca 2115  
 Gly Ile Val Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala  
 690 695 700

att cga gaa gta ctt gga tca act ggc tgg gat gtt ctt gtt cct gga 2163  
 Ile Arg Glu Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly  
 705 710 715

gtg gcc cat gga act ctg atg cgg gtg gaa aga att ctt cct gga tca 2211  
 Val Ala His Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser  
 720 725 730

tta cct tca tct gtc aaa gaa cct gtg gtt cta att gta gat aag gct 2259  
 Leu Pro Ser Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala  
 735 740 745

gat gga gat gaa gag gtc aaa gct gct ggg gat aat ata gtt ggt gtt 2307  
 Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val  
 750 755 760 765

att ctt ctt cag gaa cta cct cac ctt tca cat ctt ggt gtt aga gct 2355  
 Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala  
 770 775 780

cgt caa gag aat gtt gta ttt gta act tgt gaa tat gat gac aca gtt 2403

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Arg Gln Glu Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val  
 785 790 795

aca gat gtg tat ttg ctt gag gga aaa tat atc aga tta gaa gca tca Thr Asp Val Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser 800 805 810	2451
tcc atc aat gtc aat ctc tca ata gtt tca gaa aaa aat gac aat gct Ser Ile Asn Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala 815 820 825	2499
gtc tct aca gaa cca aat agt aca ggg aat cca ttt caa cag aaa ctc Val Ser Thr Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu 830 835 840 845	2547
caa aat gaa ttc tct cta cca tcg gat atc gag atg cca ctg caa atg Gln Asn Glu Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met 850 855 860	2595
tct aag caa aaa agc aaa tca gga gtg aat ggt agt ttt gct gct ctt Ser Lys Gln Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu 865 870 875	2643
gag ctt tca gaa gct tca gtg gaa tca gct ggt gca aaa gct gct gca Glu Leu Ser Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala 880 885 890	2691
tgc aga act ctt tct gtt ctt gct tca ttg tct aat aaa gtc tat agt Cys Arg Thr Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser 895 900 905	2739
gat caa gga gtt cca gca gcc ttt aga gtc cct tct ggt gct gtg ata Asp Gln Gly Val Pro Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile 910 915 920 925	2787
cca ttt gga tca atg gag gat gcg ctc aag aaa agt gga tca ctg gaa Pro Phe Gly Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu 930 935 940	2835
tcc ttt aca agc ctt cta gaa aag att gaa aca gcc aaa gtc gaa aat Ser Phe Thr Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn 945 950 955	2883
ggt gaa gtt gat agc ctg gcg ttg gag cta caa gca ata att tca cat Gly Glu Val Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His 960 965 970	2931
ctt tcc cca ccg gag gag act att ata ttt ctc aaa aga atc ttc cca Leu Ser Pro Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro 975 980 985	2979
cag gat gtc cgg ttg att gtt aga tct agt gct aat gtg gag gat ttg Gln Asp Val Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu 990 995 1000 1005	3027
gct ggt atg tca gct gct ggt ctc tat gat tca att ccc aat gtc Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val 1010 1015 1020	3072
agt ctc atg gac cca tgt gcc ttt gga gct gcg gtt ggg aag gtt Ser Leu Met Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val 1025 1030 1035	3117
tgg gct tct tta tac aca agg aga gcc atc cta agc cgt cga gcc Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala 1040 1045 1050	3162
gct ggt gtt tat cag aga gac gcg aca atg gct gtt ctt gtc caa	3207

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ala Gly Val Tyr	Gln 1055	Arg Asp Ala Thr	Met 1060	Ala Val Leu Val	Gln 1065	
gaa ata ctg cag	cca 1070	gat ctc tcc ttc	gtg 1075	ctt cat act gtt	tgc 1080	3252
Glu Ile Leu Gln	Pro 1070	Asp Leu Ser Phe	Val 1075	Leu His Thr Val	Cys 1080	
ccc gct gac cat	gac 1085	ccc aag gtt gtc	cag 1090	gct gag gtc gcc	cct 1095	3297
Pro Ala Asp His	Asp 1085	Pro Lys Val Val	Gln 1090	Ala Glu Val Ala	Pro 1095	
ggg ctg ggt gaa	acg 1100	ctt gct tca gga	acc 1105	cgt ggc acc ccg	tgg 1110	3342
Gly Leu Gly Glu	Thr 1100	Leu Ala Ser Gly	Thr 1105	Arg Gly Thr Pro	Trp 1110	
agg ctg tca tgt	aac 1115	aaa ttc gat gga	aaa 1120	gtt gcc act ctt	gcc 1125	3387
Arg Leu Ser Cys	Asn 1115	Lys Phe Asp Gly	Lys 1120	Val Ala Thr Leu	Ala 1125	
ttt tca aat ttc	agt 1130	gag gag atg gtg	gtg 1135	cac aac tct ggt	cct 1140	3432
Phe Ser Asn Phe	Ser 1130	Glu Glu Met Val	Val 1135	His Asn Ser Gly	Pro 1140	
gcc aat gga gaa	gta 1145	att cgt ctt act	gtt 1150	gat tac agc aag	aag 1155	3477
Ala Asn Gly Glu	Val 1145	Ile Arg Leu Thr	Val 1150	Asp Tyr Ser Lys	Lys 1155	
cca ttg tcg gtt	gat 1160	aca acc ttt agg	aag 1165	cag ttt ggt cag	cga 1170	3522
Pro Leu Ser Val	Asp 1160	Thr Thr Phe Arg	Lys 1165	Gln Phe Gly Gln	Arg 1170	
ctg gct gcg att	ggc 1175	cag tat ctg gag	cag 1180	aag ttc ggg agt	gca 1185	3567
Leu Ala Ala Ile	Gly 1175	Gln Tyr Leu Glu	Gln 1180	Lys Phe Gly Ser	Ala 1185	
cag gat gtg gaa	ggt 1190	tgc ctg gtt ggg	aaa 1195	gat att ttt ata	gtg 1200	3612
Gln Asp Val Glu	Gly 1190	Cys Leu Val Gly	Lys 1195	Asp Ile Phe Ile	Val 1200	
caa agc agg cca	cag 1205	cca tag aagccgaatt c				3644
Gln Ser Arg Pro	Gln 1205	Pro				

<210> 4

<211> 1206

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val  
20 25 30

Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala  
35 40 45



Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys  
 50 55 60

Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys  
 65 70 75 80

Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser  
 85 90 95

Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr  
 100 105 110

Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val  
 115 120 125

Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp  
 130 135 140

Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe  
 145 150 155 160

Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu  
 165 170 175

Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly  
 180 185 190

Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp  
 195 200 205

Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser  
 210 215 220

Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser  
 225 230 235 240

Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly  
 245 250 255

Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg  
 260 265 270

Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser  
 275 280 285

Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr  
 290 295 300

Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly  
 305 310 315 320

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg  
 325 330 335  
 Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val  
 340 345 350  
 Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu  
 355 360 365  
 Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg  
 370 375 380  
 Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln  
 385 390 395 400  
 Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu  
 405 410 415  
 Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr  
 420 425 430  
 Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe  
 435 440 445  
 Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu  
 450 455 460  
 Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg  
 465 470 475 480  
 Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr  
 485 490 495  
 Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
 500 505 510  
 Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp  
 515 520 525  
 Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu  
 530 535 540  
 Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu  
 545 550 555 560  
 Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr  
 565 570 575  
 Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln  
 580 585 590

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn  
595 600 605

Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys  
610 615 620

Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp  
625 630 635 640

Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile  
645 650 655

Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp  
660 665 670

Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val  
675 680 685

Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu  
690 695 700

Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His  
705 710 715 720

Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser  
725 730 735

Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp  
740 745 750

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu  
755 760 765

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu  
770 775 780

Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val  
785 790 795 800

Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn  
805 810 815

Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr  
820 825 830

Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu  
835 840 845

Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln  
850 855 860

Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser  
 865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr  
 885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly  
 900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly  
 915 920 925

Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr  
 930 935 940

Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val  
 945 950 955 960

Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro  
 965 970 975

Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val  
 980 985 990

Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met  
 995 1000 1005

Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met  
 1010 1015 1020

Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser  
 1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val  
 1040 1045 1050

Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu  
 1055 1060 1065

Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp  
 1070 1075 1080

His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly  
 1085 1090 1095

Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser  
 1100 1105 1110

Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn  
 1115 1120 1125

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly  
 1130 1135 1140

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser  
 1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala  
 1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val  
 1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg  
 1190 1195 1200

Pro Gln Pro  
 1205

<210> 5  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana, Oryza sativa

<400> 5  
 Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 5124  
 <212> DNA  
 <213> Citrus reticulata

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (257)..(4684)  
 <223>

<300>  
 <308> EMBL / AY094062  
 <309> 2003-05-03

<400> 6  
gcacgagctc ttattacaag gtgccacgcg tcgtccgcga ctgagataaa tcgcaagtgt 60  
cgctccagat tttagtactt gtttcttacg gactccgtga aaaaaaccaa aatcaaataa 120  
tagcgaatag ccatagtcac attctcagct tcatcaatat ctctaccaag cagtatctct 180  
tcgtatatatt accatccact tatcgtttca tgctccaatt actctgagct aagaagtgt 240  
cttattgtag aggaat atg agc aat agc ata ggc cgt aat gta ctc cac cag 292  
Met Ser Asn Ser Ile Gly Arg Asn Val Leu His Gln  
1 5 10  
agc ttg ctt tgt tca acg gtt ttt gag cat caa agc aac cgt cat tct 340  
Ser Leu Leu Cys Ser Thr Val Phe Glu His Gln Ser Asn Arg His Ser  
15 20 25  
tct ggc att cct gca aac tct ttg ttt caa gct gtc tct ata aat caa 388  
Ser Gly Ile Pro Ala Asn Ser Leu Phe Gln Ala Val Ser Ile Asn Gln  
30 35 40  
ccg gcg ggg gcg tcg gca gca cgc aag tcg cct tta tct acc aaa ttt 436  
Pro Ala Gly Ala Ser Ala Ala Arg Lys Ser Pro Leu Ser Thr Lys Phe  
45 50 55 60  
tac ggg acg agt ttg aat gct aga cca aag atg gcc atg gga agg cat 484  
Tyr Gly Thr Ser Leu Asn Ala Arg Pro Lys Met Ala Met Gly Arg His  
65 70 75  
cgc cct gtt ttg atc act cca cgt gct gta tta gcc gtg gat tca gct 532  
Arg Pro Val Leu Ile Thr Pro Arg Ala Val Leu Ala Val Asp Ser Ala  
80 85 90  
tct gag ctt gca gga aaa ttc aac ctt gaa ggg aat gtt gaa ttg cag 580  
Ser Glu Leu Ala Gly Lys Phe Asn Leu Glu Gly Asn Val Glu Leu Gln  
95 100 105  
att aca gtt ggt gct cca act cca ggg tct ttg aca caa gta aat att 628  
Ile Thr Val Gly Ala Pro Thr Pro Gly Ser Leu Thr Gln Val Asn Ile  
110 115 120  
gag atc tca tat agt agc aat tcc ttg ctt ctg cac tgg ggt gcg ata 676  
Glu Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Ala Ile  
125 130 135 140  
cgt gac aaa aag gaa aag tgg gta ctt cct tct cgt ccg cca gat ggg 724  
Arg Asp Lys Lys Glu Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg Pro Pro Asp Gly  
145 150 155  
acc aaa ata tta aag aat aga gcc ctt aga act ccc ttt gtg agc tct 772  
Thr Lys Ile Leu Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Ser Ser  
160 165 170  
ggt tcc aaa tct ctc gtt aaa tta gag ata gat gat cct gca ata gaa 820  
Gly Ser Lys Ser Leu Val Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile Glu  
175 180 185  
gca gta gag ttt ctt ata ctc gat gaa gcc cag aat aaa tgg ttc aaa 868  
Ala Val Glu Phe Leu Ile Leu Asp Glu Ala Gln Asn Lys Trp Phe Lys  
190 195 200  
aac aat ggt gca aat ttt cat gta aag tta cca tca gag agg agt ttg 916  
Asn Asn Gly Ala Asn Phe His Val Lys Leu Pro Ser Glu Arg Ser Leu  
205 210 215 220  
att caa aat gtt tca gtt cct gaa gat ctt gta cag act caa gca tat 964  
Ile Gln Asn Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Thr Gln Ala Tyr  
225 230 235

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tta agg tgg gaa aga aag ggt aaa cag att tat act cct gaa caa gag Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Glu 240 245 250	1012
aag gag gag tat gaa gca gct cgc act gag ctg ctg gaa gaa att gtt Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Val 255 260 265	1060
aga ggt act tct gtg gag gac ctg cga gca aaa cta aca aac aaa aat Arg Gly Thr Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Thr Asn Lys Asn 270 275 280	1108
gat aga caa gaa att aag gaa tct tct tcc cat gga aca aaa aat gcg Asp Arg Gln Glu Ile Lys Glu Ser Ser Ser His Gly Thr Lys Asn Ala 285 290 295 300	1156
ata ccg gat gat ctt gtg caa ata caa tct tat ata cgg tgg gag aga Ile Pro Asp Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Arg Trp Glu Arg 305 310 315	1204
gct ggg aag ccc aat tac tct gca gac caa cag ctt aga gaa ttt gag Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Ser Ala Asp Gln Gln Leu Arg Glu Phe Glu 320 325 330	1252
gaa gca aga aaa gaa ttg caa tct gaa cta gag aag ggt atc tct ctt Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Leu 335 340 345	1300
gat gaa ata tgg aaa aag att aca aaa ggg gag atc cag act aag gtc Asp Glu Ile Trp Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val 350 355 360	1348
tct gat caa ctt aaa act aaa aag tat ttt aga act gaa agg att cag Ser Asp Gln Leu Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Thr Glu Arg Ile Gln 365 370 375 380	1396
agg aag cag agg gac ttt atg cag att cta aac aaa cat gtg gct gaa Arg Lys Gln Arg Asp Phe Met Gln Ile Leu Asn Lys His Val Ala Glu 385 390 395	1444
ccc aca gag aag aag aat att tca gtt gaa cca aaa gcc ttg aca cca Pro Thr Glu Lys Lys Asn Ile Ser Val Glu Pro Lys Ala Leu Thr Pro 400 405 410	1492
gtt gaa ctt ttc gtc ggg gca act gaa gaa cag gag ggt gat tct att Val Glu Leu Phe Val Gly Ala Thr Glu Glu Gln Glu Gly Asp Ser Ile 415 420 425	1540
ctt aac aag aag atc tac aag ctt gct ggc aaa gaa ctt ctg gta ctt Leu Asn Lys Lys Ile Tyr Lys Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Val Leu 430 435 440	1588
gtg cac aag cct ggt ggc aag acc aaa att cac cta gct act gat ggc Val His Lys Pro Gly Gly Lys Thr Lys Ile His Leu Ala Thr Asp Gly 445 450 455 460	1636
aaa gag cca ctc att ctc cac tgg gct ttg tct aag aag gct gga gaa Lys Glu Pro Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Lys Ala Gly Glu 465 470 475	1684
tgg ttg gct ccg cct cca agt gta ctg cct gca ggt tca gtt ttg ctg Trp Leu Ala Pro Pro Ser Val Leu Pro Ala Gly Ser Val Leu Leu 480 485 490	1732
agt ggg tca gtt gaa aca aca ttc aca act agc tct ctt gcg gat ctg Ser Gly Ser Val Glu Thr Thr Phe Thr Thr Ser Ser Leu Ala Asp Leu 495 500 505	1780

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cct	tat	cag	gtc	caa	tca	att	gaa	ata	gag	att	gaa	gaa	gaa	ggt	tat	1828
Pro	Tyr	Gln	Val	Gln	Ser	Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Glu	Glu	Glu	Gly	Tyr	
	510					515					520					
ggt	gga	atg	cca	tct	gtc	ctt	cag	tct	ggc	gga	aac	tgg	ata	aag	aat	1876
Val	Gly	Met	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	Ser	Gly	Gly	Asn	Trp	Ile	Lys	Asn	
	525				530				535						540	
aag	ggc	tct	gac	ttc	tat	ggt	gac	ttt	agc	tat	gaa	tct	aag	caa	ggt	1924
Lys	Gly	Ser	Asp	Phe	Tyr	Val	Asp	Phe	Ser	Tyr	Glu	Ser	Lys	Gln	Val	
				545					550					555		
caa	cag	gat	ttt	ggc	gat	ggc	aaa	ggt	acg	gcc	aag	gct	ttg	ttg	gag	1972
Gln	Gln	Asp	Phe	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly	Thr	Ala	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	
			560					565					570			
aaa	ata	gca	gga	ttg	gaa	att	gag	gca	cag	aag	tcc	ttt	atg	cac	cgg	2020
Lys	Ile	Ala	Gly	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Gln	Lys	Ser	Phe	Met	His	Arg	
		575					580					585				
ttt	aac	att	gca	gca	gac	ttg	ata	caa	gaa	gcc	aaa	gag	gct	ggt	gaa	2068
Phe	Asn	Ile	Ala	Ala	Asp	Leu	Ile	Gln	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Glu	
	590					595					600					
ctg	ggc	ttt	gct	ggg	atc	ttg	gtg	tgg	atg	agg	ttt	atg	gct	aca	agg	2116
Leu	Gly	Phe	Ala	Gly	Ile	Leu	Val	Trp	Met	Arg	Phe	Met	Ala	Thr	Arg	
	605				610					615					620	
cag	cta	ata	tgg	aat	aaa	aac	tac	aat	ggt	aaa	cca	cgt	gaa	atc	agt	2164
Gln	Leu	Ile	Trp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys	Pro	Arg	Glu	Ile	Ser	
				625					630					635		
aaa	gcc	cag	gat	agg	ctt	aca	gac	ctg	ctc	cag	aat	gtc	tac	att	agt	2212
Lys	Ala	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Gln	Asn	Val	Tyr	Ile	Ser	
			640					645					650			
aat	cca	gag	tat	agg	gaa	att	gtg	cgc	atg	att	ttg	tct	act	ggt	ggc	2260
Asn	Pro	Glu	Tyr	Arg	Glu	Ile	Val	Arg	Met	Ile	Leu	Ser	Thr	Val	Gly	
		655					660					665				
cgt	gga	ggt	gaa	gga	gat	gtg	gga	cag	cga	att	cgc	gat	gaa	atc	ctg	2308
Arg	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Arg	Ile	Arg	Asp	Glu	Ile	Leu	
	670					675					680					
ggt	atc	cag	aga	aac	aat	aat	tgc	aag	ggt	gga	atg	atg	gaa	gaa	tgg	2356
Val	Ile	Gln	Arg	Asn	Asn	Asn	Cys	Lys	Gly	Gly	Met	Met	Glu	Glu	Trp	
	685				690				695						700	
cat	cag	aag	ttg	cat	aat	aac	act	agt	cct	gat	gat	ggt	ata	att	tgt	2404
His	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp	Val	Ile	Ile	Cys	
				705					710					715		
cag	gca	ttg	att	gat	tat	att	aaa	agt	gac	ttc	gac	atc	agt	gcc	tac	2452
Gln	Ala	Leu	Ile	Asp	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp	Phe	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	
			720					725					730			
tgg	aag	act	ttg	aat	gac	aat	ggc	att	acg	aaa	gaa	cgt	ctt	cta	agt	2500
Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	Asp	Asn	Gly	Ile	Thr	Lys	Glu	Arg	Leu	Leu	Ser	
		735					740					745				
tat	gat	cgt	gcg	atc	cat	tct	gag	cca	aac	ttc	aga	aga	gat	cag	aag	2548
Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	His	Ser	Glu	Pro	Asn	Phe	Arg	Arg	Asp	Gln	Lys	
	750					755					760					
gat	ggt	ctg	ctg	cgt	gac	cta	gga	aac	tac	atg	aga	acc	tta	aag	gcg	2596
Asp	Gly	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	Asn	Tyr	Met	Arg	Thr	Leu	Lys	Ala	
					770				775						780	



## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtt cat tca ggt gca gat ctt gag tct gct atc acg aat tgc ttg ggc Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Thr Asn Cys Leu Gly 785 790 795	2644
tac aga tct gag ggt caa ggg ttc atg gtc ggg gtg cag ata aat cct Tyr Arg Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro 800 805 810	2692
ata ccg aac ttg cca tct gga ttt cca gaa ttg ctt caa ttt gtc tct Ile Pro Asn Leu Pro Ser Gly Phe Pro Glu Leu Leu Gln Phe Val Ser 815 820 825	2740
gag cat gtt gaa gat aga aat gta gaa gca ttg ctt gag ggt ttg ctg Glu His Val Glu Asp Arg Asn Val Glu Ala Leu Leu Glu Gly Leu Leu 830 835 840	2788
gag gct cgt caa gag att cgg cca ttg ctg tgc aag cac aat gat cgt Glu Ala Arg Gln Glu Ile Arg Pro Leu Leu Cys Lys His Asn Asp Arg 845 850 855 860	2836
ctg aag gat cta tta ttt ttg gac ata gcc ctt gag tct agt gtt agg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Glu Ser Ser Val Arg 865 870 875	2884
aca gct att gaa aaa gga tac gag gaa ttg aac gag gct gga ccg gag Thr Ala Ile Glu Lys Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Glu Ala Gly Pro Glu 880 885 890	2932
aaa atc atg tac ttt gtc tct ctg att ctt gaa aat ctc gca ctt tca Lys Ile Met Tyr Phe Val Ser Leu Ile Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser 895 900 905	2980
tta gat gac aat gag gat ctc atc tac tgt tta aag ggt tgg agt aat Leu Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Ser Asn 910 915 920	3028
gct tta agc atg tcc aag agt aaa agt gat aac tgg gca tta ttt gca Ala Leu Ser Met Ser Lys Ser Lys Ser Asp Asn Trp Ala Leu Phe Ala 925 930 935 940	3076
aaa tca gtt ctt gac aga act cgc ctt gca ctc gcc ggc aag gca gac Lys Ser Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Gly Lys Ala Asp 945 950 955	3124
tgg tac cag aaa gtt ttg caa cct tcg gca gag tat ctt gga acg ctg Trp Tyr Gln Lys Val Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Thr Leu 960 965 970	3172
ttg agt gtt gat aag tgg gct gtg gac ata ttt aca gaa gaa atg atc Leu Ser Val Asp Lys Trp Ala Val Asp Ile Phe Thr Glu Glu Met Ile 975 980 985	3220
cgt gct gga tca gct gca gct cta tcc tta ctc ctt aat cga ctt gat Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu Leu Asn Arg Leu Asp 990 995 1000	3268
cca gtt ctt cgg aag aca gct agt ctg gga agt tgg cag gtt atc Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Ser Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile 1005 1010 1015	3313
agc cct gtt gaa gtt ttt gga tat gtc gca gtt gtg gat gag tta Ser Pro Val Glu Val Phe Gly Tyr Val Ala Val Val Asp Glu Leu 1020 1025 1030	3358
cta gct gtg cag gat aaa tct tat gat cag cct aca ata tta ctg Leu Ala Val Gln Asp Lys Ser Tyr Asp Gln Pro Thr Ile Leu Leu 1035 1040 1045	3403

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gca Ala 1050	aga Arg	cgt Arg	gta Val	aaa Lys	gga Gly 1055	gag Glu	gaa Glu	gaa Glu	att Ile	cca Pro 1060	cat His	ggc Gly	aca Thr	gtt Val	3448
gct Ala 1065	gta Val	ctg Leu	aca Thr	gcg Ala	gat Asp 1070	atg Met	cca Pro	gat Asp	gtc Val	cta Leu 1075	tca Ser	cat His	gtt Val	tca Ser	3493
gtt Val 1080	cga Arg	gct Ala	aga Arg	aat Asn	tgc Cys 1085	aag Lys	gtt Val	tgc Cys	ttc Phe	gct Ala 1090	aca Thr	tgc Cys	ttt Phe	gat Asp	3538
ccc Pro 1095	aat Asn	atc Ile	ttg Leu	gct Ala	gac Asp 1100	cta Leu	caa Gln	tca Ser	aat Asn	gaa Glu 1105	ggg Gly	aaa Lys	atg Met	ctg Leu	3583
cac His 1110	cta Leu	aaa Lys	cca Pro	aca Thr	tct Ser 1115	gct Ala	gat Asp	att Ile	gca Ala	tat Tyr 1120	agt Ser	gtg Val	gtg Val	gag Glu	3628
ggc Gly 1125	agt Ser	gag Glu	cta Leu	caa Gln	gat Asp 1130	tca Ser	agt Ser	tca Ser	gct Ala	aac Asn 1135	ttg Leu	aaa Lys	gaa Glu	gaa Glu	3673
gat Asp 1140	ggt Gly	cct Pro	tca Ser	tct Ser	tct Ser 1145	gtt Val	gca Ala	tta Leu	gtc Val	aaa Lys 1150	aag Lys	cag Gln	ttt Phe	gct Ala	3718
ggc Gly 1155	aga Arg	tat Tyr	gct Ala	ata Ile	aca Thr 1160	tct Ser	gat Asp	gag Glu	ttc Phe	act Thr 1165	ggt Gly	gaa Glu	ctg Leu	gtg Val	3763
ggt Gly 1170	gct Ala	aaa Lys	tca Ser	cgt Arg	aat Asn 1175	att Ile	gca Ala	tat Tyr	ctg Leu	aaa Lys 1180	gga Gly	aaa Lys	gta Val	ccg Pro	3808
tct Ser 1185	tgg Trp	att Ile	ggg Gly	att Ile	ccg Pro 1190	aca Thr	tca Ser	gtt Val	gcc Ala	cta Leu 1195	cca Pro	ttt Phe	gga Gly	gtg Val	3853
ttt Phe 1200	gag Glu	aag Lys	gtt Val	ctt Leu	tca Ser 1205	gat Asp	gac Asp	ata Ile	aat Asn	cag Gln 1210	gca Ala	gtg Val	gca Ala	gag Glu	3898
aag Lys 1215	ttg Leu	caa Gln	att Ile	ttg Leu	aaa Lys 1220	caa Gln	aag Lys	tta Leu	gga Gly	gag Glu 1225	gaa Glu	gac Asp	cat His	agt Ser	3943
gcc Ala 1230	ctt Leu	agg Arg	gag Glu	att Ile	cgg Arg 1235	gaa Glu	aca Thr	gtt Val	tta Leu	cag Gln 1240	atg Met	aaa Lys	gca Ala	cca Pro	3988
aac Asn 1245	cag Gln	ttg Leu	gtc Val	caa Gln	gaa Glu 1250	ctg Leu	aag Lys	aca Thr	gag Glu	atg Met 1255	aaa Lys	agt Ser	tct Ser	ggt Gly	4033
atg Met 1260	cct Pro	tgg Trp	cct Pro	ggt Gly	gat Asp 1265	gaa Glu	ggt Gly	gag Glu	cag Gln	cgc Arg 1270	tgg Trp	gag Glu	caa Gln	gca Ala	4078
tgg Trp 1275	atg Met	gct Ala	atc Ile	aag Lys	aag Lys 1280	gtc Val	tgg Trp	gct Ala	tca Ser	aaa Lys 1285	tgg Trp	aat Asn	gag Glu	aga Arg	4123
gca Ala 1290	ttc Phe	ttc Phe	agc Ser	aca Thr	agg Arg 1295	aga Arg	gta Val	aaa Lys	tta Leu	gat Asp 1300	cat His	gaa Glu	tat Tyr	ctc Leu	4168

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tgc Cys 1305	atg Met	gct Ala	gtc Val	ctg Leu	gtt Val 1310	cag Gln	gaa Glu	ata Ile	atc Ile	aat Asn 1315	gct Ala	gac Asp	tat Tyr	gca Ala	4213
ttt Phe 1320	ggt Val	atc Ile	cat His	aca Thr	act Thr 1325	aat Asn	ccc Pro	tct Ser	tca Ser	gga Gly 1330	gat Asp	tca Ser	tca Ser	gaa Glu	4258
ata Ile 1335	tat Tyr	gct Ala	gag Glu	gtg Val 1340	aag Lys	gga Gly	ctt Leu	gga Gly	gaa Glu 1345	act Thr	ctc Leu	ggt Val	gga Gly		4303
gct Ala 1350	tat Tyr	cca Pro	ggc Gly	cgt Arg	gct Ala 1355	ttg Leu	agt Ser	ttt Phe	gtc Val	tgc Cys 1360	aag Lys	aaa Lys	aat Asn	gat Asp	4348
ttg Leu 1365	aag Lys	tct Ser	cct Pro	cgg Arg	gtt Val 1370	ttg Leu	ggg Gly	tat Tyr	cca Pro	agc Ser 1375	aag Lys	ccc Pro	att Ile	ggg Gly	4393
ctt Leu 1380	ttt Phe	ata Ile	aga Arg	cga Arg	tca Ser 1385	atc Ile	atc Ile	ttc Phe	cga Arg	tct Ser 1390	gat Asp	tcc Ser	aat Asn	ggg Gly	4438
gaa Glu 1395	gat Asp	ctg Leu	gaa Glu	ggg Gly	tat Tyr 1400	gct Ala	ggg Gly	gct Ala	ggc Gly	ctt Leu 1405	tat Tyr	gat Asp	agt Ser	gtg Val	4483
cca Pro 1410	atg Met	gat Asp	gaa Glu	gcc Ala	gag Glu 1415	aaa Lys	gtt Val	gtg Val	ctt Leu	gat Asp 1420	tac Tyr	tct Ser	tca Ser	gac Asp	4528
cat His 1425	ctg Leu	atc Ile	act Thr	gac Asp	gga Gly 1430	cac His	ttc Phe	cag Gln	caa Gln	tca Ser 1435	att Ile	ctc Leu	tct Ser	tcc Ser	4573
att Ile 1440	gct Ala	cgt Arg	gca Ala	gga Gly	tgt Cys 1445	gag Glu	att Ile	gag Glu	gag Glu	cta Leu 1450	ttt Phe	gga Gly	tct Ser	gca Ala	4618
caa Gln 1455	gac Asp	att Ile	gaa Glu	ggg Gly	gtg Val 1460	gtt Val	agg Arg	gat Asp	ggg Gly	aaa Lys 1465	ata Ile	tat Tyr	ggt Val	gtc Val	4663
cag Gln 1470	aca Thr	aga Arg	ccc Pro	caa Gln	atg Met 1475	tga	ggctgttctt	tttctttttt	attttttcct						4714
gattgggaag	ctattgataa	aagcattata	tcaatgaaaa	aaattaaaaa	gaaattatag										4774
aggtcaagcc	tagaaaggag	gaaagggggag	tgagtatttta	tttggaagca	agtgaataa										4834
aggtacaaaa	ggagagagga	ataaagttgc	aattttccag	aacatgtaaa	ttcacttgga										4894
aattgtgtac	tggatgcttt	gctctgtatg	aagactaccg	ggtcgaaatg	acaacatttt										4954
tgtccatagg	catgtaatgt	tacatttgat	tctgggtaat	accatacgct	tcattatagg										5014
ggatcagcag	atactatggt	gtagttgaaa	tgtaatgtta	taataaaatg	ttaatacaaa										5074
tggtataaca	tttgatttaa	cctgtaacgt	gaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa											5124

<210> 7

<211> 1475

<212> PRT

<213> Citrus reticulata

<400> 7

Met Ser Asn Ser Ile Gly Arg Asn Val Leu His Gln Ser Leu Leu Cys  
1 5 10 15  
Ser Thr Val Phe Glu His Gln Ser Asn Arg His Ser Ser Gly Ile Pro  
20 25 30  
Ala Asn Ser Leu Phe Gln Ala Val Ser Ile Asn Gln Pro Ala Gly Ala  
35 40 45  
Ser Ala Ala Arg Lys Ser Pro Leu Ser Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Ser  
50 55 60  
Leu Asn Ala Arg Pro Lys Met Ala Met Gly Arg His Arg Pro Val Leu  
65 70 75 80  
Ile Thr Pro Arg Ala Val Leu Ala Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Ala  
85 90 95  
Gly Lys Phe Asn Leu Glu Gly Asn Val Glu Leu Gln Ile Thr Val Gly  
100 105 110  
Ala Pro Thr Pro Gly Ser Leu Thr Gln Val Asn Ile Glu Ile Ser Tyr  
115 120 125  
Ser Ser Asn Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Ala Ile Arg Asp Lys Lys  
130 135 140  
Glu Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg Pro Pro Asp Gly Thr Lys Ile Leu  
145 150 155 160  
Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Ser Ser Gly Ser Lys Ser  
165 170 175  
Leu Val Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile Glu Ala Val Glu Phe  
180 185 190  
Leu Ile Leu Asp Glu Ala Gln Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Ala  
195 200 205  
Asn Phe His Val Lys Leu Pro Ser Glu Arg Ser Leu Ile Gln Asn Val  
210 215 220  
Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Thr Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu  
225 230 235 240

Arg Lys Gly Lys Gln Ile Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu Tyr  
 245 250 255

Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Leu Glu Glu Ile Val Arg Gly Thr Ser  
 260 265 270

Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Thr Asn Lys Asn Asp Arg Gln Glu  
 275 280 285

Ile Lys Glu Ser Ser Ser His Gly Thr Lys Asn Ala Ile Pro Asp Asp  
 290 295 300

Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Ile Arg Trp Glu Arg Ala Gly Lys Pro  
 305 310 315 320

Asn Tyr Ser Ala Asp Gln Gln Leu Arg Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys  
 325 330 335

Glu Leu Gln Ser Glu Leu Glu Lys Gly Ile Ser Leu Asp Glu Ile Trp  
 340 345 350

Lys Lys Ile Thr Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ser Asp Gln Leu  
 355 360 365

Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Thr Glu Arg Ile Gln Arg Lys Gln Arg  
 370 375 380

Asp Phe Met Gln Ile Leu Asn Lys His Val Ala Glu Pro Thr Glu Lys  
 385 390 395 400

Lys Asn Ile Ser Val Glu Pro Lys Ala Leu Thr Pro Val Glu Leu Phe  
 405 410 415

Val Gly Ala Thr Glu Glu Gln Glu Gly Asp Ser Ile Leu Asn Lys Lys  
 420 425 430

Ile Tyr Lys Leu Ala Gly Lys Glu Leu Leu Val Leu Val His Lys Pro  
 435 440 445

Gly Gly Lys Thr Lys Ile His Leu Ala Thr Asp Gly Lys Glu Pro Leu  
 450 455 460

Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Lys Ala Gly Glu Trp Leu Ala Pro  
 465 470 475 480

Pro Pro Ser Val Leu Pro Ala Gly Ser Val Leu Leu Ser Gly Ser Val  
 485 490 495

Glu Thr Thr Phe Thr Thr Ser Ser Leu Ala Asp Leu Pro Tyr Gln Val  
 500 505 510

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Gln Ser Ile Glu Ile Glu Ile Glu Glu Glu Tyr Val Gly Met Pro  
 515 520 525

Ser Val Leu Gln Ser Gly Gly Asn Trp Ile Lys Asn Lys Gly Ser Asp  
 530 535 540

Phe Tyr Val Asp Phe Ser Tyr Glu Ser Lys Gln Val Gln Gln Asp Phe  
 545 550 555 560

Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu Glu Lys Ile Ala Gly  
 565 570 575

Leu Glu Ile Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala  
 580 585 590

Ala Asp Leu Ile Gln Glu Ala Lys Glu Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala  
 595 600 605

Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp  
 610 615 620

Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp  
 625 630 635 640

Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Val Tyr Ile Ser Asn Pro Glu Tyr  
 645 650 655

Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu  
 660 665 670

Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg  
 675 680 685

Asn Asn Asn Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu  
 690 695 700

His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Ile Ile Cys Gln Ala Leu Ile  
 705 710 715 720

Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Ile Ser Ala Tyr Trp Lys Thr Leu  
 725 730 735

Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala  
 740 745 750

Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Asp Gly Leu Leu  
 755 760 765

Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly  
 770 775 780

Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Thr Asn Cys Leu Gly Tyr Arg Ser Glu  
 785 790 795 800

Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Ile Pro Asn Leu  
 805 810 815

Pro Ser Gly Phe Pro Glu Leu Leu Gln Phe Val Ser Glu His Val Glu  
 820 825 830

Asp Arg Asn Val Glu Ala Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln  
 835 840 845

Glu Ile Arg Pro Leu Leu Cys Lys His Asn Asp Arg Leu Lys Asp Leu  
 850 855 860

Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Glu Ser Ser Val Arg Thr Ala Ile Glu  
 865 870 875 880

Lys Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Glu Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr  
 885 890 895

Phe Val Ser Leu Ile Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Leu Asp Asp Asn  
 900 905 910

Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Ser Asn Ala Leu Ser Met  
 915 920 925

Ser Lys Ser Lys Ser Asp Asn Trp Ala Leu Phe Ala Lys Ser Val Leu  
 930 935 940

Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Gly Lys Ala Asp Trp Tyr Gln Lys  
 945 950 955 960

Val Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Thr Leu Leu Ser Val Asp  
 965 970 975

Lys Trp Ala Val Asp Ile Phe Thr Glu Glu Met Ile Arg Ala Gly Ser  
 980 985 990

Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg  
 995 1000 1005

Lys Thr Ala Ser Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu  
 1010 1015 1020

Val Phe Gly Tyr Val Ala Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln  
 1025 1030 1035

Asp Lys Ser Tyr Asp Gln Pro Thr Ile Leu Leu Ala Arg Arg Val  
 1040 1045 1050

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro His Gly Thr Val Ala Val Leu Thr  
 1055 1060 1065

Ala Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg  
 1070 1075 1080

Asn Cys Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu  
 1085 1090 1095

Ala Asp Leu Gln Ser Asn Glu Gly Lys Met Leu His Leu Lys Pro  
 1100 1105 1110

Thr Ser Ala Asp Ile Ala Tyr Ser Val Val Glu Gly Ser Glu Leu  
 1115 1120 1125

Gln Asp Ser Ser Ser Ala Asn Leu Lys Glu Glu Asp Gly Pro Ser  
 1130 1135 1140

Ser Ser Val Ala Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala  
 1145 1150 1155

Ile Thr Ser Asp Glu Phe Thr Gly Glu Leu Val Gly Ala Lys Ser  
 1160 1165 1170

Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Ile Gly  
 1175 1180 1185

Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val  
 1190 1195 1200

Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Ala Val Ala Glu Lys Leu Gln Ile  
 1205 1210 1215

Leu Lys Gln Lys Leu Gly Glu Glu Asp His Ser Ala Leu Arg Glu  
 1220 1225 1230

Ile Arg Glu Thr Val Leu Gln Met Lys Ala Pro Asn Gln Leu Val  
 1235 1240 1245

Gln Glu Leu Lys Thr Glu Met Lys Ser Ser Gly Met Pro Trp Pro  
 1250 1255 1260

Gly Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile  
 1265 1270 1275

Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Phe Phe Ser  
 1280 1285 1290

Thr Arg Arg Val Lys Leu Asp His Glu Tyr Leu Cys Met Ala Val  
 1295 1300 1305



Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His  
 1310 1315 1320

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu  
 1325 1330 1335

Val Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly  
 1340 1345 1350

Arg Ala Leu Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Lys Ser Pro  
 1355 1360 1365

Arg Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg  
 1370 1375 1380

Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu  
 1385 1390 1395

Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu  
 1400 1405 1410

Ala Glu Lys Val Val Leu Asp Tyr Ser Ser Asp His Leu Ile Thr  
 1415 1420 1425

Asp Gly His Phe Gln Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala  
 1430 1435 1440

Gly Cys Glu Ile Glu Glu Leu Phe Gly Ser Ala Gln Asp Ile Glu  
 1445 1450 1455

Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro  
 1460 1465 1470

Gln Met  
 1475

<210> 8

<211> 4200

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(4200)

<223>

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; EMBL / AF312027

&lt;309&gt; 2001-01-08

&lt;400&gt; 8

atg	agt	aac	tct	gta	gtg	cat	aac	tta	ctt	aac	cgg	ggt	ttg	att	cgt	48
Met	Ser	Asn	Ser	Val	Val	His	Asn	Leu	Leu	Asn	Arg	Gly	Leu	Ile	Arg	
1				5					10					15		
cct	ctt	aac	ttt	gaa	cat	caa	aac	aag	ctc	aac	tcc	tct	gtg	tac	caa	96
Pro	Leu	Asn	Phe	Glu	His	Gln	Asn	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Val	Tyr	Gln	
			20					25					30			
act	tca	aca	gca	aat	ccg	gct	ctt	ggc	aag	att	ggc	aga	tca	aaa	ctt	144
Thr	Ser	Thr	Ala	Asn	Pro	Ala	Leu	Gly	Lys	Ile	Gly	Arg	Ser	Lys	Leu	
		35					40					45				
tac	ggg	aaa	ggt	ctt	aag	cag	gca	gga	cgc	agt	ctg	gtc	act	gaa	aca	192
Tyr	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Arg	Ser	Leu	Val	Thr	Glu	Thr	
	50					55					60					
gga	gga	aga	cct	ctc	tca	ttt	gtt	cca	cga	gct	gtc	ctt	gcc	atg	gat	240
Gly	Gly	Arg	Pro	Leu	Ser	Phe	Val	Pro	Arg	Ala	Val	Leu	Ala	Met	Asp	
65				70					75					80		
cct	cag	gca	gcc	gag	aaa	ttt	agt	ctt	gac	gga	aat	atc	gat	tta	ctg	288
Pro	Gln	Ala	Ala	Glu	Lys	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Asn	Ile	Asp	Leu	Leu	
				85					90					95		
gtt	gaa	gtc	act	tct	aca	act	gta	aga	gaa	gta	aat	atc	cag	ata	gct	336
Val	Glu	Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Arg	Glu	Val	Asn	Ile	Gln	Ile	Ala	
			100				105						110			
tat	aca	agt	gac	aca	ttg	ttc	cta	cac	tgg	ggt	gca	att	ctt	gac	aac	384
Tyr	Thr	Ser	Asp	Thr	Leu	Phe	Leu	His	Trp	Gly	Ala	Ile	Leu	Asp	Asn	
		115					120					125				
aaa	gaa	aat	tgg	gtt	cta	cct	tct	cgc	tct	ccg	gat	aga	act	caa	aac	432
Lys	Glu	Asn	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Arg	Ser	Pro	Asp	Arg	Thr	Gln	Asn	
	130					135					140					
ttc	aag	aac	agt	gcg	ctt	aga	act	cca	ttt	gtg	aaa	tcc	ggt	ggc	aat	480
Phe	Lys	Asn	Ser	Ala	Leu	Arg	Thr	Pro	Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Gly	Asn	
145				150					155					160		
tct	cac	ctt	aaa	cta	gag	ata	gat	gat	cct	gcc	ata	cac	gct	att	gag	528
Ser	His	Leu	Lys	Leu	Glu	Ile	Asp	Asp	Pro	Ala	Ile	His	Ala	Ile	Glu	
				165					170					175		
ttc	ctt	ata	ttt	gac	gaa	agt	cgg	aac	aaa	tgg	tat	aaa	aat	aat	ggt	576
Phe	Leu	Ile	Phe	Asp	Glu	Ser	Arg	Asn	Lys	Trp	Tyr	Lys	Asn	Asn	Gly	
			180					185					190			
cag	aat	ttt	cat	ata	aac	tta	cca	acg	gaa	agg	aat	gtg	aaa	caa	aat	624
Gln	Asn	Phe	His	Ile	Asn	Leu	Pro	Thr	Glu	Arg	Asn	Val	Lys	Gln	Asn	
		195					200					205				
gtt	tct	gtt	cct	gaa	gat	ctt	gta	cag	atc	caa	gca	tat	ctt	aga	tgg	672
Val	Ser	Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Val	Gln	Ile	Gln	Ala	Tyr	Leu	Arg	Trp	
		210				215					220					
gaa	cgt	aag	ggt	aaa	caa	atg	tac	aac	cct	gag	aaa	gag	aag	gag	gag	720
Glu	Arg	Lys	Gly	Lys	Gln	Met	Tyr	Asn	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu	
225				230						235				240		

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tat gaa gcc gcc cgg acg gag cta cgg gag gaa atg atg cga ggt gct Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Arg Glu Glu Met Met Arg Gly Ala 245 250 255	768
tca gtg gaa gat ctc aga gca aag ctg ttg aag aaa gat aac agt aat Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Leu Lys Lys Asp Asn Ser Asn 260 265 270	816
gaa tcc cca aaa tct aat ggg aca tca tcc agt gga cgg gag gaa aag Glu Ser Pro Lys Ser Asn Gly Thr Ser Ser Ser Gly Arg Glu Glu Lys 275 280 285	864
aaa aaa gtt tcc aag caa cca gag cgt aaa aaa aat tat aac act gac Lys Lys Val Ser Lys Gln Pro Glu Arg Lys Lys Asn Tyr Asn Thr Asp 290 295 300	912
aag atc cag cgc aag gga agg gac ctg act aag ctt atc tat aag cat Lys Ile Gln Arg Lys Gly Arg Asp Leu Thr Lys Leu Ile Tyr Lys His 305 310 315 320	960
gtt gct gat ttt gtt gaa cca gaa tcc aaa tcc tca tct gaa cca cgg Val Ala Asp Phe Val Glu Pro Glu Ser Lys Ser Ser Ser Glu Pro Arg 325 330 335	1008
tcc tta aca act ctg gag ata tac gcc aaa gca aag gag gaa caa gaa Ser Leu Thr Thr Leu Glu Ile Tyr Ala Lys Ala Lys Glu Glu Gln Glu 340 345 350	1056
acc act cca gtc ttt agc aag aaa aca ttc aag ctt gaa ggc agt gcg Thr Thr Pro Val Phe Ser Lys Lys Thr Phe Lys Leu Glu Gly Ser Ala 355 360 365	1104
att ttg gtg ttt gtt act aaa ctt tcc gga aag acg aaa att cat gtg Ile Leu Val Phe Val Thr Lys Leu Ser Gly Lys Thr Lys Ile His Val 370 375 380	1152
gca act gat ttt aaa gag ccg gtt acc ctt cac tgg gct ttg tct caa Ala Thr Asp Phe Lys Glu Pro Val Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Gln 385 390 395 400	1200
aag ggt gga gaa tgg ttg gac cca cct tca gat ata ctg cca cca aac Lys Gly Gly Glu Trp Leu Asp Pro Pro Ser Asp Ile Leu Pro Pro Asn 405 410 415	1248
tct ttg cca gta cgt ggt gct gtt gat aca aaa ctg acc atc act tca Ser Leu Pro Val Arg Gly Ala Val Asp Thr Lys Leu Thr Ile Thr Ser 420 425 430	1296
aca gat ctt cct agt ccg gtt caa act ttt gag ctg gaa ata gaa ggt Thr Asp Leu Pro Ser Pro Val Gln Thr Phe Glu Leu Glu Ile Glu Gly 435 440 445	1344
gac agc tac aag ggc atg ccg ttt gta ctc aat gct ggt gaa agg tgg Asp Ser Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Asn Ala Gly Glu Arg Trp 450 455 460	1392
att aaa aat aat gac agt gac ttt tat gtg gac ttt gct aaa gaa gaa Ile Lys Asn Asn Asp Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ala Lys Glu Glu 465 470 475 480	1440
aaa cat gtt cag aag gat tat ggc gat gga aag ggt aca gcc aag cat Lys His Val Gln Lys Asp Tyr Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys His 485 490 495	1488
tta ctg gac aaa atc gca gat ttg gag agt gag gcc cag aag tct ttc Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Leu Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe 500 505 510	1536

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

atg cat cga ttc aac att gca gca gat ctt gtg gac gag gca aaa agt Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys Ser 515 520 525	1584
gct ggt caa ctg ggc ttt gca ggg atc cta gtc tgg atg agg ttt atg Ala Gly Gln Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met 530 535 540	1632
gct aca aga cag ctt gtg tgg aac aaa aac tat aat gtt aag cca agg Ala Thr Arg Gln Leu Val Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg 545 550 555 560	1680
gag ata agc aaa gcg cag gat aga ctg act gac ctt ctc cag gac gtt Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val 565 570 575	1728
tat gca agt tat cca gag tac aga gaa ctt ttg cgg atg ata atg tct Tyr Ala Ser Tyr Pro Glu Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Met Ile Met Ser 580 585 590	1776
act gta ggt cga gga ggt gaa gga gat gtc ggg caa cga atc cgt gac Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp 595 600 605	1824
gaa att cta gtc atc cag cgg aaa aat gac tgc aag ggt gga att atg Glu Ile Leu Val Ile Gln Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Ile Met 610 615 620	1872
gag gaa tgg cat cag aag ttg cat aac aac act agt cca gat gat gtt Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val 625 630 635 640	1920
gtc atc tgt cag gca ttg atg gat tat atc aaa agt gac ttt gac tta Val Ile Cys Gln Ala Leu Met Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu 645 650 655	1968
agt gtt tac tgg aag acc ttg aac gat aat ggc ata acc aaa gag cga Ser Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg 660 665 670	2016
ctc tta agt tat gat cgt gct ata cat tct gaa cca aat ttt aga gga Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly 675 680 685	2064
gaa caa aaa gac ggt ctt ttg cgt gat ctt gga cac tac atg agg act Glu Gln Lys Asp Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr 690 695 700	2112
tta aag gct gtt cat tca ggg gca gac ctt gag tcg gct ata caa aat Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Gln Asn 705 710 715 720	2160
tgc atg ggc tac caa gat gac ggt gaa ggt ttc atg gtt ggg gtg cag Cys Met Gly Tyr Gln Asp Asp Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln 725 730 735	2208
ata aat cct gta tca gga ttg cct tct gga tat cca gac ttg ctt cgt Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Tyr Pro Asp Leu Leu Arg 740 745 750	2256
ttc gtc cta gaa cat gtt gaa gaa aag aat gta gag cca ctt ctt gag Phe Val Leu Glu His Val Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu 755 760 765	2304
ggt ttg ctt gaa gct cgt caa gag cta agg cca ctt ctg ctg aag tcc Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Arg Pro Leu Leu Lys Ser 770 775 780	2352

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cat His 785	gac Asp	cgc Arg	ctc Leu	aag Lys	gat Asp 790	ctg Leu	tta Leu	ttc Phe	ttg Leu	gac Asp 795	ctc Leu	gct Ala	ctt Leu	gat Asp	tct Ser 800	2400
act Thr	gtc Val	aga Arg	aca Thr	gcg Ala 805	att Ile	gaa Glu	aga Arg	gga Gly	tat Tyr 810	gag Glu	caa Gln	ttg Leu	aat Asn	gat Asp 815	gct Ala	2448
gga Gly	cct Pro	gag Glu	aaa Lys 820	atc Ile	atg Met	tac Tyr	ttc Phe	atc Ile 825	agc Ser	cta Leu	gtt Val	ctt Leu	gaa Glu 830	aat Asn	ctt Leu	2496
gcc Ala	ctc Leu	tct Ser 835	tca Ser	gat Asp	gac Asp	aat Asn	gaa Glu 840	gac Asp	ctt Leu	ata Ile	tac Tyr	tgc Cys 845	ttg Leu	aag Lys	gga Gly	2544
tgg Trp	caa Gln 850	ttt Phe	gcc Ala	ctc Leu	gac Asp	atg Met 855	tgc Cys	aag Lys	agc Ser	aaa Lys	aaa Lys 860	gat Asp	cac His	tgg Trp	gct Ala	2592
ctg Leu 865	tat Tyr	gca Ala	aaa Lys	tct Ser	gtt Val 870	ctt Leu	gac Asp	aga Arg	agc Ser	cga Arg 875	cta Leu	gca Ala	ctg Leu	gca Ala	agc Ser 880	2640
aaa Lys	gct Ala	gag Glu	agg Arg	tac Tyr 885	ctt Leu	gaa Glu	att Ile	ctg Leu	caa Gln 890	cca Pro	tcg Ser	gct Ala	gaa Glu	tat Tyr 895	ctt Leu	2688
gga Gly	tct Ser	tgt Cys	ctt Leu	gga Gly	gtc Val	gat Asp	cag Gln	tcg Ser 905	gct Ala	gtt Val	agt Ser	ata Ile	ttt Phe 910	act Thr	gaa Glu	2736
gag Glu	atc Ile	att Ile 915	cga Arg	gct Ala	gga Gly	tct Ser	gca Ala 920	gca Ala	gca Ala	ttg Leu	tcg Ser	tca Ser 925	ctt Leu	gtt Val	aac Asn	2784
cga Arg 930	ctt Leu	gac Asp	cca Pro	gtt Val	ctt Leu	agg Arg 935	aag Lys	act Thr	gct Ala	aac Asn	ttg Leu 940	gga Gly	agt Ser	tgg Trp	cag Gln	2832
gtt Val 945	att Ile	agt Ser	cct Pro	gta Val	gag Glu 950	gtc Val	gtc Val	gga Gly	tat Tyr	gtc Val 955	att Ile	gtt Val	gtg Val	gac Asp	gaa Glu 960	2880
ttg Leu	ctc Leu	act Thr	gta Val	cag Gln 965	aat Asn	aaa Lys	acc Thr	tac Tyr	gat Asp 970	aga Arg	cct Pro	aca Thr	att Ile	ata Ile 975	gtt Val	2928
gca Ala	aac Asn	aga Arg	gtg Val 980	aga Arg	gga Gly	gag Glu	gag Glu	gaa Glu 985	atc Ile	cct Pro	gat Asp	ggt Gly	gca Ala 990	gtt Val	gcg Ala	2976
gta Val	ctg Leu	aca Thr 995	cct Pro	gac Asp	atg Met	ccg Pro	gat Asp 1000	gta Val	cta Leu	tct Ser	cat His	gtt Val 1005	tct Ser	gtt Val	cga Arg	3024
gca Ala	aga Arg 1010	aat Asn	gga Gly	aag Lys	atc Ile	tgc Cys 1015	ttt Phe	gcc Ala	aca Thr	tgt Cys	ttt Phe 1020	gat Asp	tct Ser	ggt Gly		3069
atc Ile	tta Leu 1025	tct Ser	gac Asp	ctc Leu	caa Gln	gga Gly 1030	aaa Lys	gat Asp	gga Gly	aaa Lys	ctg Leu 1035	ttg Leu	agc Ser	cta Leu		3114
caa Gln 1040	cca Pro	acc Thr	tct Ser	gca Ala	gat Asp	gta Val 1045	gtc Val	tat Tyr	aaa Lys	gag Glu	gta Val 1050	aac Asn	gat Asp	agt Ser		3159

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gag Glu	ctt Leu	tcg Ser	agt Ser	cca Pro	agt Ser	tca Ser	gac Asp	aac Asn	ctg Leu	gaa Glu	gat Asp	gcc Ala	cct Pro	cca Pro	3204
1055						1060					1065				
agt Ser	att Ile	tct Ser	ttg Leu	gtc Val	aag Lys	aaa Lys	cag Gln	ttt Phe	gcg Ala	ggt Gly	aga Arg	tat Tyr	gct Ala	ata Ile	3249
1070						1075					1080				
tca Ser	tct Ser	gag Glu	gag Glu	ttc Phe	aca Thr	agt Ser	gac Asp	ttg Leu	ggt Val	ggt Gly	gct Ala	aaa Lys	tca Ser	aga Arg	3294
1085						1090					1095				
aat Asn	atc Ile	ggg Gly	tat Tyr	ctg Leu	aaa Lys	gga Gly	aaa Lys	ggt Val	cct Pro	tct Ser	tgg Trp	ggt Val	ggt Gly	atc Ile	3339
1100						1105					1110				
cca Pro	act Thr	tca Ser	ggt Val	gcg Ala	ttg Leu	cca Pro	ttt Phe	ggt Gly	ggt Val	ttt Phe	gag Glu	aag Lys	ggt Val	atc Ile	3384
1115						1120					1125				
tcc Ser	gaa Glu	aag Lys	gcg Ala	aat Asn	cag Gln	gcg Ala	gtg Val	aac Asn	gat Asp	aaa Lys	ttg Leu	cta Leu	gta Val	ttg Leu	3429
1130						1135					1140				
aag Lys	aaa Lys	act Thr	ctt Leu	gat Asp	gag Glu	gga Gly	gac Asp	caa Gln	ggt Gly	gct Ala	ctg Leu	aag Lys	gaa Glu	atc Ile	3474
1145						1150					1155				
cgg Arg	cag Gln	aca Thr	ctg Leu	ttg Leu	ggg Gly	cta Leu	gtt Val	gca Ala	ccc Pro	cca Pro	gaa Glu	ctg Leu	gtt Val	gaa Glu	3519
1160						1165					1170				
gaa Glu	ctg Leu	aaa Lys	agt Ser	act Thr	atg Met	aaa Lys	agt Ser	tct Ser	gac Asp	atg Met	cca Pro	tgg Trp	ccg Pro	ggt Gly	3564
1175						1180					1185				
gat Asp	gaa Glu	ggt Gly	gaa Glu	cag Gln	aga Arg	tgg Trp	gag Glu	caa Gln	gct Ala	tgg Trp	gca Ala	gcc Ala	att Ile	aaa Lys	3609
1190						1195					1200				
aag Lys	gtc Val	tgg Trp	gct Ala	tcg Ser	aaa Lys	tgg Trp	aac Asn	gag Glu	aga Arg	gca Ala	tac Tyr	ttc Phe	agc Ser	acg Thr	3654
1205						1210					1215				
agg Arg	aaa Lys	gta Val	aaa Lys	ctg Leu	gat Asp	cat His	gac Asp	tat Tyr	ctc Leu	tgc Cys	atg Met	gct Ala	ggt Val	ttg Leu	3699
1220						1225					1230				
gtc Val	caa Gln	gaa Glu	gtc Val	atc Ile	aat Asn	gcg Ala	gat Asp	tac Tyr	gca Ala	ttc Phe	gtc Val	att Ile	cac His	aca Thr	3744
1235						1240					1245				
act Thr	aat Asn	cca Pro	tct Ser	tct Ser	gga Gly	gat Asp	tca Ser	tca Ser	gag Glu	att Ile	tat Tyr	gcc Ala	gag Glu	gtg Val	3789
1250						1255					1260				
gtc Val	aaa Lys	ggc Gly	ctt Leu	ggg Gly	gaa Glu	act Thr	ctt Leu	gta Val	gga Gly	gca Ala	tat Tyr	ccc Pro	ggt Gly	cgg Arg	3834
1265						1270					1275				
tct Ser	ctg Leu	agt Ser	ttc Phe	atc Ile	tgc Cys	aag Lys	aaa Lys	aac Asn	aac Asn	ctt Leu	gat Asp	tcg Ser	cct Pro	ctg Leu	3879
1280						1285					1290				
gtg Val	ttg Leu	ggc Gly	tac Tyr	cca Pro	agc Ser	aaa Lys	ccg Pro	att Ile	ggg Gly	ctg Leu	ttc Phe	ata Ile	aga Arg	cgt Arg	3924
1295						1300					1305				

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

tca atc atc ttc aga tct gat tcc aat gga gaa gat ctt gaa ggt	3969
Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly	
1310 1315 1320	
tat gca ggt gca ggc ctc tac gac agt gta cca atg gac gag gaa	4014
Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu	
1325 1330 1335	
gac caa gtc gtg ctc gat tac aca aca gat cct ctg atc act gac	4059
Asp Gln Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Thr Asp	
1340 1345 1350	
ttg agc ttc cag aaa aag gtt ctc tca gac att gca cgc gct gga	4104
Leu Ser Phe Gln Lys Lys Val Leu Ser Asp Ile Ala Arg Ala Gly	
1355 1360 1365	
gat gcc att gag aaa ctc tat gga act gca cag gac att gaa ggt	4149
Asp Ala Ile Glu Lys Leu Tyr Gly Thr Ala Gln Asp Ile Glu Gly	
1370 1375 1380	
gtg atc aga gac ggg aag ctc tat gtc gtc cag aca cga cca caa	4194
Val Ile Arg Asp Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln	
1385 1390 1395	
gtg tga	4200
Val	

<210> 9

<211> 1399

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

Met Ser Asn Ser Val Val His Asn Leu Leu Asn Arg Gly Leu Ile Arg
1 5 10 15
Pro Leu Asn Phe Glu His Gln Asn Lys Leu Asn Ser Ser Val Tyr Gln
20 25 30
Thr Ser Thr Ala Asn Pro Ala Leu Gly Lys Ile Gly Arg Ser Lys Leu
35 40 45
Tyr Gly Lys Gly Leu Lys Gln Ala Gly Arg Ser Leu Val Thr Glu Thr
50 55 60
Gly Gly Arg Pro Leu Ser Phe Val Pro Arg Ala Val Leu Ala Met Asp
65 70 75 80
Pro Gln Ala Ala Glu Lys Phe Ser Leu Asp Gly Asn Ile Asp Leu Leu
85 90 95
Val Glu Val Thr Ser Thr Thr Val Arg Glu Val Asn Ile Gln Ile Ala
100 105 110

Tyr Thr Ser Asp Thr Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Ile Leu Asp Asn  
 115 120 125  
 Lys Glu Asn Trp Val Leu Pro Ser Arg Ser Pro Asp Arg Thr Gln Asn  
 130 135 140  
 Phe Lys Asn Ser Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Ser His Leu Lys Leu Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ile His Ala Ile Glu  
 165 170 175  
 Phe Leu Ile Phe Asp Glu Ser Arg Asn Lys Trp Tyr Lys Asn Asn Gly  
 180 185 190  
 Gln Asn Phe His Ile Asn Leu Pro Thr Glu Arg Asn Val Lys Gln Asn  
 195 200 205  
 Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp  
 210 215 220  
 Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Asn Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Arg Glu Glu Met Met Arg Gly Ala  
 245 250 255  
 Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Lys Leu Leu Lys Lys Asp Asn Ser Asn  
 260 265 270  
 Glu Ser Pro Lys Ser Asn Gly Thr Ser Ser Ser Gly Arg Glu Glu Lys  
 275 280 285  
 Lys Lys Val Ser Lys Gln Pro Glu Arg Lys Lys Asn Tyr Asn Thr Asp  
 290 295 300  
 Lys Ile Gln Arg Lys Gly Arg Asp Leu Thr Lys Leu Ile Tyr Lys His  
 305 310 315 320  
 Val Ala Asp Phe Val Glu Pro Glu Ser Lys Ser Ser Ser Glu Pro Arg  
 325 330 335  
 Ser Leu Thr Thr Leu Glu Ile Tyr Ala Lys Ala Lys Glu Glu Gln Glu  
 340 345 350  
 Thr Thr Pro Val Phe Ser Lys Lys Thr Phe Lys Leu Glu Gly Ser Ala  
 355 360 365  
 Ile Leu Val Phe Val Thr Lys Leu Ser Gly Lys Thr Lys Ile His Val  
 370 375 380



Ala Thr Asp Phe Lys Glu Pro Val Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Gln  
385 390 395 400

Lys Gly Gly Glu Trp Leu Asp Pro Pro Ser Asp Ile Leu Pro Pro Asn  
405 410 415

Ser Leu Pro Val Arg Gly Ala Val Asp Thr Lys Leu Thr Ile Thr Ser  
420 425 430

Thr Asp Leu Pro Ser Pro Val Gln Thr Phe Glu Leu Glu Ile Glu Gly  
435 440 445

Asp Ser Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Asn Ala Gly Glu Arg Trp  
450 455 460

Ile Lys Asn Asn Asp Ser Asp Phe Tyr Val Asp Phe Ala Lys Glu Glu  
465 470 475 480

Lys His Val Gln Lys Asp Tyr Gly Asp Gly Lys Gly Thr Ala Lys His  
485 490 495

Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Leu Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe  
500 505 510

Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Val Asp Glu Ala Lys Ser  
515 520 525

Ala Gly Gln Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met  
530 535 540

Ala Thr Arg Gln Leu Val Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg  
545 550 555 560

Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val  
565 570 575

Tyr Ala Ser Tyr Pro Glu Tyr Arg Glu Leu Leu Arg Met Ile Met Ser  
580 585 590

Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp  
595 600 605

Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Lys Asn Asp Cys Lys Gly Gly Ile Met  
610 615 620

Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val  
625 630 635 640

Val Ile Cys Gln Ala Leu Met Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu  
645 650 655

Ser Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Asp Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg  
660 665 670

Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly  
675 680 685

Glu Gln Lys Asp Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr  
690 695 700

Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Gln Asn  
705 710 715 720

Cys Met Gly Tyr Gln Asp Asp Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln  
725 730 735

Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Tyr Pro Asp Leu Leu Arg  
740 745 750

Phe Val Leu Glu His Val Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu  
755 760 765

Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Ser  
770 775 780

His Asp Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Leu Ala Leu Asp Ser  
785 790 795 800

Thr Val Arg Thr Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ala  
805 810 815

Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu  
820 825 830

Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly  
835 840 845

Trp Gln Phe Ala Leu Asp Met Cys Lys Ser Lys Lys Asp His Trp Ala  
850 855 860

Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Ser Arg Leu Ala Leu Ala Ser  
865 870 875 880

Lys Ala Glu Arg Tyr Leu Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu  
885 890 895

Gly Ser Cys Leu Gly Val Asp Gln Ser Ala Val Ser Ile Phe Thr Glu  
900 905 910

Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Ser Leu Val Asn  
915 920 925

Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln  
 930 935 940  
 Val Ile Ser Pro Val Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Val Val Asp Glu  
 945 950 955 960  
 Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Thr Tyr Asp Arg Pro Thr Ile Ile Val  
 965 970 975  
 Ala Asn Arg Val Arg Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala  
 980 985 990  
 Val Leu Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg  
 995 1000 1005  
 Ala Arg Asn Gly Lys Ile Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Ser Gly  
 1010 1015 1020  
 Ile Leu Ser Asp Leu Gln Gly Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ser Leu  
 1025 1030 1035  
 Gln Pro Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Lys Glu Val Asn Asp Ser  
 1040 1045 1050  
 Glu Leu Ser Ser Pro Ser Ser Asp Asn Leu Glu Asp Ala Pro Pro  
 1055 1060 1065  
 Ser Ile Ser Leu Val Lys Lys Gln Phe Ala Gly Arg Tyr Ala Ile  
 1070 1075 1080  
 Ser Ser Glu Glu Phe Thr Ser Asp Leu Val Gly Ala Lys Ser Arg  
 1085 1090 1095  
 Asn Ile Gly Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Ile  
 1100 1105 1110  
 Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Ile  
 1115 1120 1125  
 Ser Glu Lys Ala Asn Gln Ala Val Asn Asp Lys Leu Leu Val Leu  
 1130 1135 1140  
 Lys Lys Thr Leu Asp Glu Gly Asp Gln Gly Ala Leu Lys Glu Ile  
 1145 1150 1155  
 Arg Gln Thr Leu Leu Gly Leu Val Ala Pro Pro Glu Leu Val Glu  
 1160 1165 1170  
 Glu Leu Lys Ser Thr Met Lys Ser Ser Asp Met Pro Trp Pro Gly  
 1175 1180 1185

Asp Glu Gly Glu Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Ala Ala Ile Lys  
 1190 1195 1200  
 Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr  
 1205 1210 1215  
 Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu  
 1220 1225 1230  
 Val Gln Glu Val Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr  
 1235 1240 1245  
 Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val  
 1250 1255 1260  
 Val Lys Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg  
 1265 1270 1275  
 Ser Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Asn Asn Leu Asp Ser Pro Leu  
 1280 1285 1290  
 Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Arg  
 1295 1300 1305  
 Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly  
 1310 1315 1320  
 Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu  
 1325 1330 1335  
 Asp Gln Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp Pro Leu Ile Thr Asp  
 1340 1345 1350  
 Leu Ser Phe Gln Lys Lys Val Leu Ser Asp Ile Ala Arg Ala Gly  
 1355 1360 1365  
 Asp Ala Ile Glu Lys Leu Tyr Gly Thr Ala Gln Asp Ile Glu Gly  
 1370 1375 1380  
 Val Ile Arg Asp Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln  
 1385 1390 1395

Val

<210> 10

<211> 4851

<212> DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (105)..(4499)

&lt;223&gt;

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; EMBL / Y09533

&lt;309&gt; 1998-07-30

&lt;400&gt; 10

catcttcatc	gaatttctcg	aagcttcttc	gctaatttcc	tggtttcttc	actcaaatc	60
gacgtttcta	gctgaacttg	agtgaattaa	gccagtggga	ggat	atg agt aat tcc	116
					Met Ser Asn Ser	
					1	
tta ggg aat aac ttg ctg tac cag gga ttc cta acc tca aca gtg ttg	164					
Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu						
5 10 15 20						
gaa cat aaa agt aga atc agt cct cct tgt gtt gga ggc aat tct ttg	212					
Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu						
25 30 35						
ttt caa caa caa gtg atc tcg aaa tca cct tta tca act gag ttt cga	260					
Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg						
40 45 50						
ggt aac agg tta aag gtg cag aaa aag aaa ata cct atg gaa aag aag	308					
Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Glu Lys Lys						
55 60 65						
cgt gct ttt tct agt tct cct cat gct gta ctt acc act gat acc tct	356					
Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser						
70 75 80						
tct gag cta gca gaa aag ttc agt cta ggg ggg aat att gag cta cag	404					
Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn Ile Glu Leu Gln						
85 90 100						
gtt gat gtt agg cct ccc act tca ggt gat gtg tcc ttt gtg gat ttt	452					
Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser Phe Val Asp Phe						
105 110 115						
caa gta aca aat ggt agt gat aaa ctg ttt ttg cac tgg ggg gca gta	500					
Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Val						
120 125 130						
aaa ttc ggg aaa gaa aca tgg tct ctt ccg aat gat cgt cca gat ggg	548					
Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp Arg Pro Asp Gly						
135 140 145						
acc aaa gtg tac aag aac aaa gca ctt aga act cca ttt gtt aaa tct	596					
Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser						
150 155 160						

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ggc tct aac tcc atc ctg aga ctg gag ata cga gac act gct atc gaa Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu 165 170 175 180	644
gct att gag ttt ctc ata tac gat gaa gcc cac gat aaa tgg ata aag Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp Lys Trp Ile Lys 185 190 195	692
aat aat ggt ggt aat ttt cgt gtc aaa ttg tca aga aaa gag ata cga Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg 200 205 210	740
ggc cca gat gtt tct gtt cct gag gag ctt gta cag atc caa tca tat Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr 215 220 225	788
ttg agg tgg gag agg aag gga aaa cag aat tac ccc cct gag aaa gag Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Glu 230 235 240	836
aag gag gaa tat gag gct gct cga act gtg cta cag gag gaa ata gct Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln Glu Glu Ile Ala 245 250 255 260	884
cgt ggt gct tcc ata cag gac att cga gca agg cta aca aaa act aat Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn 265 270 275	932
gat aaa agt caa agc aaa gaa gag cct ctt cat gta aca aag agt gat Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp 280 285 290	980
ata cct gat gac ctt gcc caa gca caa gct tac att agg tgg gag aaa Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys 295 300 305	1028
gca gga aag ccg aac tat cct cca gaa aag caa att gaa gaa ctc gaa Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu 310 315 320	1076
gaa gca aga aga gaa ttg caa ctt gag ctt gag aaa ggc att acc ctt Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ile Thr Leu 325 330 335 340	1124
gat gag ttg cgg aaa acg att aca aaa ggg gag ata aaa act aag gtg Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val 345 350 355	1172
gaa aag cac ctg aaa aga agt tct ttt gcc gtt gaa aga atc caa aga Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg 360 365 370	1220
aag aag aga gac ttt ggg cat ctt att aat aag tat act tcc agt cct Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro 375 380 385	1268
gca gta caa gta caa aag gtc ttg gaa gaa cca cca gcc tta tct aaa Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys 390 395 400	1316
att aag ctg tat gcc aag gag aag gag gag cag att gat gat ccg atc Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile 405 410 415 420	1364
cta aat aaa aag atc ttt aag gtc gat gat ggg gag cta ctg gta ctg Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu 425 430 435	1412

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gta gca aag tcc tct ggg aag aca aaa gta cat cta gct aca gat ctg Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu 440 445 450	1460
aat cag cca att act ctt cac tgg gca tta tcc aaa agt cct gga gag Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu 455 460 465	1508
tgg atg gta cca cct tca agc ata ttg cct cct ggg tca att att tta Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu 470 475 480	1556
gac aag gct gcc gaa aca cct ttt tca gcc agt tct tct gat ggt cta Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu 485 490 495 500	1604
act tct aag gta caa tct ttg gat ata gta att gaa gat ggc aat ttt Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe 505 510 515	1652
gtg ggg atg cca ttt gtt ctt ttg tct ggt gaa aaa tgg att aag aac Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn 520 525 530	1700
caa ggg tcg gat ttc tat gtt ggc ttc agt gct gca tcc aaa tta gca Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala 535 540 545	1748
ctc aag gct gct ggg gat ggc agt gga act gca aag tct tta ctg gat Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp 550 555 560	1796
aaa ata gca gat atg gaa agt gag gct cag aag tca ttt atg cac cgg Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg 565 570 575 580	1844
ttt aat att gca gct gac ttg ata gaa gat gcc act agt gct ggt gaa Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu 585 590 595	1892
ctt ggt ttt gct gga att ctt gta tgg atg agg ttc atg gct aca agg Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg 600 605 610	1940
caa ctg ata tgg aac aaa aac tat aac gta aaa cca cgt gaa ata agc Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser 615 620 625	1988
aag gct cag gac aga ctt aca gac ttg ttg cag aat gct ttc acc agt Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser 630 635 640	2036
cac cct cag tac cgt gaa att ttg cgg atg att atg tca act gtt gga His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly 645 650 655 660	2084
cgt gga ggt gaa ggg gat gta gga cag cga att agg gat gaa att ttg Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu 665 670 675	2132
gtc atc cag agg aac aat gac tgc aag ggt ggt atg atg caa gaa tgg Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp 680 685 690	2180
cat cag aaa ttg cat aat aat act agt cct gat gat gtt gtg atc tgt His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys 695 700 705	2228

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cag gca tta att gac tac atc aag agt gat ttt gat ctt ggt gtt tat	2276
Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr	
710 715 720	
tgg aaa acc ctg aat gag aac gga ata aca aaa gag cgt ctt ttg agt	2324
Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser	
725 730 735 740	
tat gac cgt gct atc cat tct gaa cca aat ttt aga gga gat caa aag	2372
Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys	
745 750 755	
ggt ggt ctt ttg cgt gat tta ggt cac tat atg aga aca ttg aag gca	2420
Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala	
760 765 770	
gtt cat tca ggt gca gat ctt gag tct gct att gca aac tgc atg ggc	2468
Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly	
775 780 785	
tac aaa act gag gga gaa ggc ttt atg gtt gga gtc cag ata aat cct	2516
Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro	
790 795 800	
gta tca ggc ttg cca tct ggc ttt cag gac ctc ctc cat ttt gtc tta	2564
Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu	
805 810 815 820	
gac cat gtg gaa gat aaa aat gtg gaa act ctt ctt gag aga ttg cta	2612
Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu	
825 830 835	
gag gct cgt gag gag ctt agg ccc ttg ctt ctc aaa cca aac aac cgt	2660
Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg	
840 845 850	
cta aag gat ctg ctg ttt ttg gac ata gca ctt gat tct aca gtt aga	2708
Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg	
855 860 865	
aca gca gta gaa agg gga tat gaa gaa ttg aac aac gct aat cct gag	2756
Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu	
870 875 880	
aaa atc atg tac ttc atc tcc ctc gtt ctt gaa aat ctc gca ctc tct	2804
Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser	
885 890 895 900	
gtg gac gat aat gaa gat ctt gtt tat tgc ttg aag gga tgg aat caa	2852
Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln	
905 910 915	
gct ctt tca atg tcc aat ggt ggg gac aac cat tgg gct tta ttt gca	2900
Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala	
920 925 930	
aaa gct gtg ctt gac aga acc cgt ctt gca ctt gca agc aag gca gag	2948
Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu	
935 940 945	
tgg tac cat cac tta ttg cag cca tct gcc gaa tat cta gga tca ata	2996
Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile	
950 955 960	
ctt ggg gtg gac caa tgg gct ttg aac ata ttt act gaa gaa att ata	3044
Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile	
965 970 975 980	



BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cgt gct gga tca gca gct tca tta tcc tct ctt ctt aat aga ctc gat	3092
Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp	
985 990 995	
ccc gtg ctt cgg aaa act gca aat cta gga agt tgg cag att atc	3137
Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile	
1000 1005 1010	
agt cca gtt gaa gcc gtt gga tat gtt gtc gtt gtg gat gag ttg	3182
Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu	
1015 1020 1025	
ctt tca gtt cag aat gaa atc tac gag aag ccc acg atc tta gta	3227
Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val	
1030 1035 1040	
gca aaa tct gtt aaa gga gag gag gaa att cct gat ggt gct gtt	3272
Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val	
1045 1050 1055	
gcc ctg ata aca cca gac atg cca gat gtt ctt tca cat gtt tct	3317
Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser	
1060 1065 1070	
gtt cga gct aga aat ggg aag gtt tgc ttt gct aca tgc ttt gat	3362
Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp	
1075 1080 1085	
ccc aat ata ttg gct gac ctc caa gca aag gaa gga agg att ttg	3407
Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu	
1090 1095 1100	
ctc tta aag cct aca cct tca gac ata atc tat agt gag gtg aat	3452
Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn	
1105 1110 1115	
gag att gag ctc caa agt tca agt aac ttg gta gaa gct gaa act	3497
Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr	
1120 1125 1130	
tca gca aca ctt aga ttg gtg aaa aag caa ttt ggt ggt tgt tac	3542
Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr	
1135 1140 1145	
gca ata tca gca gat gaa ttc aca agt gaa atg gtt gga gct aaa	3587
Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys	
1150 1155 1160	
tca cgt aat att gca tat ctg aaa gga aaa gtg cct tcc tcg gtg	3632
Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Ser Val	
1165 1170 1175	
gga att cct acg tca gta gct ctt cca ttt gga gtc ttt gag aaa	3677
Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys	
1180 1185 1190	
gta ctt tca gac gac ata aat cag gga gtg gca aaa gag ttg caa	3722
Val Leu Ser Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu Leu Gln	
1195 1200 1205	
att ctg atg aaa aaa cta tct gaa gga gac ttc agc gct ctt ggt	3767
Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu Gly	
1210 1215 1220	
gaa att cgc aca acg gtt tta gat ctt tca gca cca gct caa ttg	3812
Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu	
1225 1230 1235	

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtc	aaa	gag	ctg	aag	gag	aag	atg	cag	ggt	tct	ggc	atg	cct	tgg	3857
Val	Lys	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Met	Gln	Gly	Ser	Gly	Met	Pro	Trp	
			1240					1245					1250		
cct	ggt	gat	gaa	ggt	cca	aag	cgg	tgg	gaa	caa	gca	tgg	atg	gcc	3902
Pro	Gly	Asp	Glu	Gly	Pro	Lys	Arg	Trp	Glu	Gln	Ala	Trp	Met	Ala	
			1255					1260					1265		
ata	aaa	aag	gtg	tgg	gct	tca	aaa	tgg	aat	gag	aga	gca	tac	ttc	3947
Ile	Lys	Lys	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	Asn	Glu	Arg	Ala	Tyr	Phe	
			1270					1275					1280		
agc	aca	agg	aag	gtg	aaa	ctg	gat	cat	gac	tat	ctg	tgc	atg	gct	3992
Ser	Thr	Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	His	Asp	Tyr	Leu	Cys	Met	Ala	
			1285					1290					1295		
gtc	ctt	gtt	caa	gaa	ata	ata	aat	gct	gat	tat	gca	ttt	gtc	att	4037
Val	Leu	Val	Gln	Glu	Ile	Ile	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala	Phe	Val	Ile	
			1300					1305					1310		
cac	aca	acc	aac	cca	tct	tcc	gga	gac	gac	tca	gaa	ata	tat	gcc	4082
His	Thr	Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Asp	Ser	Glu	Ile	Tyr	Ala	
			1315					1320					1325		
gag	gtg	gtc	agg	ggc	ctt	ggg	gaa	aca	ctt	gtt	gga	gct	tat	cca	4127
Glu	Val	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Val	Gly	Ala	Tyr	Pro	
			1330					1335					1340		
gga	cgt	gct	ttg	agt	ttt	atc	tgc	aag	aaa	aag	gat	ctc	aac	tct	4172
Gly	Arg	Ala	Leu	Ser	Phe	Ile	Cys	Lys	Lys	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	
			1345					1350					1355		
cct	caa	gtg	tta	ggt	tac	cca	agc	aaa	ccg	atc	ggc	ctt	ttc	ata	4217
Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ser	Lys	Pro	Ile	Gly	Leu	Phe	Ile	
			1360					1365					1370		
aaa	aga	tct	atc	atc	ttc	cga	tct	gat	tcc	aat	ggg	gaa	gat	ttg	4262
Lys	Arg	Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	
			1375					1380					1385		
gaa	ggt	tat	gcc	ggt	gct	ggc	ctc	tac	gac	agt	gta	cca	atg	gat	4307
Glu	Gly	Tyr	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Asp	
			1390					1395					1400		
gag	gag	gaa	aaa	gtt	gta	att	gat	tac	tct	tcc	gac	cca	ttg	ata	4352
Glu	Glu	Glu	Lys	Val	Val	Ile	Asp	Tyr	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Ile	
			1405					1410					1415		
act	gat	ggt	aac	ttc	cgc	cag	aca	atc	ctg	tcc	aac	att	gct	cgt	4397
Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	Arg	Gln	Thr	Ile	Leu	Ser	Asn	Ile	Ala	Arg	
			1420					1425					1430		
gct	gga	cat	gct	atc	gag	gag	cta	tat	ggc	tct	cct	caa	gac	att	4442
Ala	Gly	His	Ala	Ile	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gly	Ser	Pro	Gln	Asp	Ile	
			1435					1440					1445		
gag	ggt	gta	gtg	agg	gat	gga	aag	att	tat	gtc	gtt	cag	aca	aga	4487
Glu	Gly	Val	Val	Arg	Asp	Gly	Lys	Ile	Tyr	Val	Val	Gln	Thr	Arg	
			1450					1455					1460		
cca	cag	atg	tga	ttatattctc	gtt	gtatggtt	gttcagagaa	gaccacagat							4539
Pro	Gln	Met													
gtgatcatat	tctcattgta	tcagatctgt	gaccacttac	ctgatacctc	ccatgaagtt										4599
acctgtatga	ttatacgtga	tccaaagcca	tcacatcatg	ttcaccttca	gctattggag										4659

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gagaagtgag aagtaggaat tgcaatatga ggaataataa gaaaaacttt gtaaaagcta 4719  
aattagctgg gtatgatata gggagaaatg tgtaaacatt gtactatata tagtatatac 4779  
acacgcatta tgtattgcat tatgcactga ataatatcgc agcatcaaag aagaaatcct 4839  
ttgggtggtt tc 4851

<210> 11

<211> 1464

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 11

Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr  
1 5 10 15

Ser Thr Val Leu Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly  
20 25 30

Gly Asn Ser Leu Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser  
35 40 45

Thr Glu Phe Arg Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro  
50 55 60

Met Glu Lys Lys Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr  
65 70 75 80

Thr Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn  
85 90 95

Ile Glu Leu Gln Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser  
100 105 110

Phe Val Asp Phe Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His  
115 120 125

Trp Gly Ala Val Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp  
130 135 140

Arg Pro Asp Gly Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro  
145 150 155 160

Phe Val Lys Ser Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp  
165 170 175

Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp  
180 185 190

Lys Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg  
 195 200 205  
 Lys Glu Ile Arg Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln  
 210 215 220  
 Ile Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro  
 225 230 235 240  
 Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln  
 245 250 255  
 Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu  
 260 265 270  
 Thr Lys Thr Asn Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val  
 275 280 285  
 Thr Lys Ser Asp Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile  
 290 295 300  
 Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys  
 325 330 335  
 Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile  
 340 345 350  
 Lys Thr Lys Val Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu  
 355 360 365  
 Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr  
 370 375 380  
 Thr Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile  
 405 410 415  
 Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu  
 420 425 430  
 Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu  
 435 440 445  
 Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys  
 450 455 460

Ser Pro Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser  
 485 490 495  
 Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu  
 500 505 510  
 Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys  
 515 520 525  
 Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala  
 530 535 540  
 Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys  
 545 550 555 560  
 Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser  
 565 570 575  
 Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr  
 580 585 590  
 Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe  
 595 600 605  
 Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro  
 610 615 620  
 Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn  
 625 630 635 640  
 Ala Phe Thr Ser His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met  
 645 650 655  
 Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg  
 660 665 670  
 Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met  
 675 680 685  
 Met Gln Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp  
 690 695 700  
 Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp  
 705 710 715 720  
 Leu Gly Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu  
 725 730 735

Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg  
740 745 750

Gly Asp Gln Lys Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg  
755 760 765

Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala  
770 775 780

Asn Cys Met Gly Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val  
785 790 795 800

Gln Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu  
805 810 815

His Phe Val Leu Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu  
820 825 830

Glu Arg Leu Leu Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys  
835 840 845

Pro Asn Asn Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp  
850 855 860

Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn  
865 870 875 880

Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn  
885 890 895

Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys  
900 905 910

Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp  
915 920 925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala  
930 935 940

Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr  
945 950 955 960

Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr  
965 970 975

Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu  
980 985 990

Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp  
995 1000 1005

Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val  
1010 1015 1020

Asp Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr  
1025 1030 1035

Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp  
1040 1045 1050

Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser  
1055 1060 1065

His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr  
1070 1075 1080

Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly  
1085 1090 1095

Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser  
1100 1105 1110

Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu  
1115 1120 1125

Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly  
1130 1135 1140

Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu Met Val  
1145 1150 1155

Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro  
1160 1165 1170

Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val  
1175 1180 1185

Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys  
1190 1195 1200

Glu Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser  
1205 1210 1215

Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro  
1220 1225 1230

Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly  
1235 1240 1245

Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala  
1250 1255 1260

Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg  
1265 1270 1275

Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu  
1280 1285 1290

Cys Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala  
1295 1300 1305

Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu  
1310 1315 1320

Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly  
1325 1330 1335

Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp  
1340 1345 1350

Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly  
1355 1360 1365

Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly  
1370 1375 1380

Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val  
1385 1390 1395

Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser Asp  
1400 1405 1410

Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn  
1415 1420 1425

Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro  
1430 1435 1440

Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val  
1445 1450 1455

Gln Thr Arg Pro Gln Met  
1460

<210> 12

<211> 4576

<212> DNA

<213> Oryza sativa



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (20)..(4393)

&lt;223&gt;

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; NCBI / AR400814

&lt;309&gt; 2003-12-18

&lt;400&gt; 12

cttacagata ttcgtgcag	atg agc gga ttc tcc gcg gca gct gct gcg gcc	52
	Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala	
	1 5 10	
gag cgg tgc gcg ctc ggc ctc ggc gtc cac gcg cgc ccc gcc tcg ccc		100
Glu Arg Cys Ala Leu Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro		
	15 20 25	
tcg ccg gcg ctg ctc ccg ccg gcg gct ctc cgc cgc gcc cgc cgt ctc		148
Ser Pro Ala Leu Leu Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu		
	30 35 40	
ccc gcg gcc acc acc acc ctc gcc gtc tcc cgt cgg agc ctc ctc gcc		196
Pro Ala Ala Thr Thr Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala		
	45 50 55	
cct cgc gcc atc gcc gct tcc acc ggc cgc gcc tcc ccg gcc ctt gtc		244
Pro Arg Ala Ile Ala Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val		
	60 65 70 75	
gga agg ttc acc ctg gat gcc aac tcc gag ctt aag gtg aca ttg aac		292
Gly Arg Phe Thr Leu Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn		
	80 85 90	
cca gca ccg cag ggt tcg gtg gtg gag atc aat cta gag gca act aac		340
Pro Ala Pro Gln Gly Ser Val Val Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn		
	95 100 105	
acc agc ggc tcc ctg ata ctg cat tgg ggc gcc ctt cgc ccg gat aga		388
Thr Ser Gly Ser Leu Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg		
	110 115 120	
gga gaa tgg ctc cta cca tcc cgg aaa cca gat ggc acg aca gtg tac		436
Gly Glu Trp Leu Leu Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr		
	125 130 135	
aag aac agg gct ctt agg acg cct ttt ata aag tca ggt gat aac tcc		484
Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser		
	140 145 150 155	
acg ctg aaa att gag ata gat gat cct gca gtg caa gcc att gag ttc		532
Thr Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe		
	160 165 170	
ctc ata ttt gat gag gca cgg aat aat tgg tac aaa aac aat ggc cag		580
Leu Ile Phe Asp Glu Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln		
	175 180 185	
aat ttc caa att cag cta caa gcg agc caa tat caa ggg cag ggt aca		628

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Asn	Phe	Gln	Ile	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gln	Tyr	Gln	Gly	Gln	Gly	Thr		
		190					195					200					
tct	act	gct	act	tct	tct	act	gtg	ggt	cca	gag	gat	ctt	gtg	cag	ata	676	
Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Ser	Thr	Val	Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Val	Gln	Ile		
	205					210					215						
caa	tca	tat	ctt	cgg	tgg	gaa	aga	aag	gga	aag	cag	tca	tat	aca	cct	724	
Gln	Ser	Tyr	Leu	Arg	Trp	Glu	Arg	Lys	Gly	Lys	Gln	Ser	Tyr	Thr	Pro		
220					225					230					235		
gag	caa	gag	aag	gag	gag	tat	gaa	gca	gca	cga	act	gag	ttg	ata	gag	772	
Glu	Gln	Glu	Lys	Glu	Glu	Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Ile	Glu		
				240					245					250			
gaa	tta	aac	aag	ggt	ggt	tct	ttg	gag	aag	cta	cga	gcg	aaa	ctg	aca	820	
Glu	Leu	Asn	Lys	Gly	Val	Ser	Leu	Glu	Lys	Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	Thr		
			255					260					265				
aag	aca	cct	gag	gca	act	gat	agt	aat	gct	cct	gca	tct	gaa	agc	act	868	
Lys	Thr	Pro	Glu	Ala	Thr	Asp	Ser	Asn	Ala	Pro	Ala	Ser	Glu	Ser	Thr		
		270				275						280					
gtg	act	act	aaa	gtc	cca	gag	gaa	ctt	gta	caa	gtc	cag	gct	tac	ata	916	
Val	Thr	Thr	Lys	Val	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Gln	Val	Gln	Ala	Tyr	Ile		
	285					290					295						
agg	tgg	gag	aaa	gca	ggc	aag	cca	aat	tat	gcc	cca	gag	aag	caa	ttg	964	
Arg	Trp	Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Pro	Asn	Tyr	Ala	Pro	Glu	Lys	Gln	Leu		
300					305					310					315		
gtc	gag	ttt	gag	gaa	gca	agg	aag	gaa	ctg	cag	tct	gag	ttg	gat	aag	1012	
Val	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Lys	Glu	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Asp	Lys		
				320					325					330			
ggg	acc	tca	ggt	gag	cag	ttg	agg	aac	aaa	att	ttg	aaa	ggg	aac	att	1060	
Gly	Thr	Ser	Val	Glu	Gln	Leu	Arg	Asn	Lys	Ile	Leu	Lys	Gly	Asn	Ile		
			335					340					345				
gag	aca	aaa	ggt	tcc	aag	cag	ctg	aag	gac	aaa	aaa	tac	ttt	tct	gtg	1108	
Glu	Thr	Lys	Val	Ser	Lys	Gln	Leu	Lys	Asp	Lys	Lys	Tyr	Phe	Ser	Val		
		350					355					360					
gaa	aga	att	cag	cgg	aaa	aaa	cga	gat	att	gtg	caa	cta	ctt	aaa	aaa	1156	
Glu	Arg	Ile	Gln	Arg	Lys	Lys	Arg	Asp	Ile	Val	Gln	Leu	Leu	Lys	Lys		
	365					370					375						
cac	aag	cct	act	ggt	atg	gaa	gcg	caa	gta	gag	act	cct	aaa	caa	ccc	1204	
His	Lys	Pro	Thr	Val	Met	Glu	Ala	Gln	Val	Glu	Thr	Pro	Lys	Gln	Pro		
					385					390					395		
act	ggt	ctg	gat	ctc	ttc	aca	aag	tca	tta	cag	gag	cag	gat	aac	tgt	1252	
Thr	Val	Leu	Asp	Leu	Phe	Thr	Lys	Ser	Leu	Gln	Glu	Gln	Asp	Asn	Cys		
				400					405					410			
gag	ggt	cta	agc	aga	aag	ctt	ttc	aag	ttc	ggt	gac	aag	gag	ata	ctg	1300	
Glu	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Phe	Lys	Phe	Gly	Asp	Lys	Glu	Ile	Leu		
			415					420					425				
gga	att	acc	acc	ggt	gct	cta	gga	aaa	acc	aaa	ggt	cac	ttg	gca	aca	1348	
Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	Lys	Val	His	Leu	Ala	Thr		
		430					435					440					
aac	tat	atg	gag	cca	ctt	ata	ctt	cac	tgg	gcg	ttg	tca	aaa	gag	aat	1396	
Asn	Tyr	Met	Glu	Pro	Leu	Ile	Leu	His	Trp	Ala	Leu	Ser	Lys	Glu	Asn		
	445					450					455						
gga	gag	tgg	cag	gca	cct	ccc	tca	agc	ata	ttg	cca	tct	ggt	tca	tca	1444	

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Gly 460	Glu	Trp	Gln	Ala	Pro 465	Pro	Ser	Ser	Ile	Leu 470	Pro	Ser	Gly	Ser	Ser 475	
ttg	cta	gac	aag	gca	tgt	gaa	act	tca	ttc	agt	gaa	tat	gaa	ttg	aat	1492
Leu	Leu	Asp	Lys	Ala 480	Cys	Glu	Thr	Ser	Phe 485	Ser	Glu	Tyr	Glu	Leu 490	Asn	
ggt	ctg	cat	tgt	cag	gtt	gtt	gag	atc	gag	ctt	gac	gat	ggt	gga	tac	1540
Gly	Leu	His	Cys 495	Gln	Val	Val	Glu	Ile 500	Glu	Leu	Asp	Asp	Gly 505	Gly	Tyr	
aag	cgg	atg	ccc	ttt	gtt	ctc	cgg	tct	ggt	gaa	aca	tgg	atg	aaa	aat	1588
Lys	Arg	Met 510	Pro	Phe	Val	Leu	Arg 515	Ser	Gly	Glu	Thr	Trp 520	Met	Lys	Asn	
aat	ggc	tct	gac	ttt	tac	ttg	gat	ttc	agc	acc	aaa	gtt	gca	aaa	aat	1636
Asn	Gly 525	Ser	Asp	Phe	Tyr	Leu 530	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys 535	Val	Ala	Lys	Asn	
aca	aag	gat	act	ggt	gat	gct	ggt	aaa	ggc	act	gct	gag	gcc	ttg	ctt	1684
Thr 540	Lys	Asp	Thr	Gly	Asp 545	Ala	Gly	Lys	Gly	Thr 550	Ala	Glu	Ala	Leu 555	Leu	
gaa	aga	ata	gca	gat	cta	gag	gaa	gat	gcc	caa	cga	tct	ctt	atg	cac	1732
Glu	Arg	Ile	Ala	Asp 560	Leu	Glu	Glu	Asp	Ala 565	Gln	Arg	Ser	Leu	Met 570	His	
aga	ttc	aat	att	gca	gca	gat	cta	gtt	gac	caa	gcg	aga	gat	aat	gga	1780
Arg	Phe	Asn	Ile 575	Ala	Ala	Asp	Leu	Val 580	Asp	Gln	Ala	Arg	Asp 585	Asn	Gly	
tta	ttg	ggt	att	att	gga	att	ttt	gtt	tgg	att	ggg	ttc	atg	gct	aca	1828
Leu	Leu	Gly 590	Ile	Ile	Gly	Ile	Phe 595	Val	Trp	Ile	Gly	Phe 600	Met	Ala	Thr	
agg	caa	cta	ata	tgg	aac	aag	aac	tac	aat	gtg	aag	cca	cgt	gag	ata	1876
Arg	Gln 605	Leu	Ile	Trp	Asn	Lys 610	Asn	Tyr	Asn	Val	Lys 615	Pro	Arg	Glu	Ile	
agc	aaa	gcc	caa	gat	agg	ttt	aca	gat	gat	ctt	gag	aat	atg	tac	aga	1924
Ser 620	Lys	Ala	Gln	Asp	Arg 625	Phe	Thr	Asp	Asp	Leu 630	Glu	Asn	Met	Tyr	Arg 635	
act	tac	cca	caa	tat	cag	gag	atc	tta	aga	atg	ata	atg	tct	gct	gtt	1972
Thr	Tyr	Pro	Gln	Tyr 640	Gln	Glu	Ile	Leu	Arg 645	Met	Ile	Met	Ser	Ala 650	Val	
ggt	cgg	gga	ggt	gaa	ggt	gat	gtt	ggt	caa	cgc	att	cgt	gat	gag	ata	2020
Gly	Arg	Gly	Gly 655	Glu	Gly	Asp	Val	Gly 660	Gln	Arg	Ile	Arg	Asp 665	Glu	Ile	
tta	gta	atc	cag	aga	aat	aat	gac	tgc	aaa	ggt	gga	atg	atg	gag	gag	2068
Leu	Val	Ile 670	Gln	Arg	Asn	Asn	Asp 675	Cys	Lys	Gly	Gly	Met 680	Met	Glu	Glu	
tgg	cac	cag	aaa	ctg	cac	aac	aat	aca	agc	cca	gat	gat	gta	gtg	atc	2116
Trp	His 685	Gln	Lys	Leu	His	Asn 690	Asn	Thr	Ser	Pro	Asp 695	Asp	Val	Val	Ile	
tgc	cag	gcc	cta	ctt	gat	tat	atc	aag	agt	gat	ttt	gat	act	ggt	gtt	2164
Cys 700	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp 705	Tyr	Ile	Lys	Ser	Asp 710	Phe	Asp	Thr	Gly	Val 715	
tac	tgg	gac	acc	ttg	aaa	aaa	ggt	ggt	ata	aca	aaa	gag	cgt	cta	ttg	2212
Tyr	Trp	Asp	Thr	Leu 720	Lys	Lys	Gly	Gly	Ile 725	Thr	Lys	Glu	Arg	Leu 730	Leu	
agc	tat	gat	cga	ccg	att	cat	tca	gag	cca	aat	ttc	agg	agt	gaa	cag	2260

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Ser Tyr Asp Arg Pro Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln  
 735 740 745

aaa gat agc tta ctc cgt gac ttg ggc aat tat atg aga agc ctc aag Lys Asp Ser Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys 750 755 760	2308
gca gtg cat tct ggt gct gat ctt gaa tct gct ata gca act tgc atg Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile 775 765	2356
gga tac aaa tca gag ggt gaa ggt ttc atg gtt ggt gtt cag att aat Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn 780 785 790 795	2404
cca gtg aag ggt ttg cca tct gga ttt cct aaa ttg ctt gaa ttt ata Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Ile 800 805 810	2452
ctt gac cat gtt gag gat aaa tca gca aga cca ctt ctt gga ggg tta Leu Asp His Val Glu Asp Lys Ser Ala Arg Pro Leu Leu Gly Gly Leu 815 820 825	2500
ttg gag gct cga gct gaa cta cac cct ttg ctc ctt ggc tct cct gaa Leu Glu Ala Arg Ala Glu Leu His Pro Leu Leu Leu Gly Ser Pro Glu 830 835 840	2548
cgc atg aag gat ctt atc ttt tta gac att gct ctt gat tct act ttc Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe 845 850 855	2596
agg aca gca gtc gaa aga tca tat gag gag ctc aat aat gta gaa cca Arg Thr Ala Val Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro 860 865 870 875	2644
gag aaa att atg tac ttc atc agt ctt gtc ctt gaa aat ctt gct tta Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu 880 885 890	2692
tcc acc gac gac aat gaa gat atc cta tat tgc tta aag gga tgg aat Ser Thr Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn 895 900 905	2740
caa gcc gtg gaa atg gct aaa cag aaa aac aac caa tgg gct ctc tat Gln Ala Val Glu Met Ala Lys Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr 910 915 920	2788
gct aaa gca ttt ctg gac aga acc aga ctt gcc ctt gca agc aag gga Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly 925 930 935	2836
gaa caa tac tat aat ttg atg cag ccc tca gct gaa tat ctt ggc tcg Glu Gln Tyr Tyr Asn Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser 940 945 950 955	2884
tta ctt aac att gac caa tgg gca gtt aat atc ttt aca gaa gaa att Leu Leu Asn Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile 960 965 970	2932
att cgt ggt gga tca gct gct acc ctg tct gct ctt ctg aat cgg att Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile 975 980 985	2980
gat cct gtt ctt agg aat gtt gca cag ctt gga agt tgg cag gtt ata Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile 990 995 1000	3028
agc cca gtt gaa gta tca ggt tac att gta gtg gtt gat gaa ttg	3073

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ser	Pro	Val	Glu	Val	Ser	Gly	Tyr	Ile	Val	Val	Val	Asp	Glu	Leu	
1005						1010					1015				
ctt	gct	gtt	caa	aac	aaa	tcc	tat	gat	aaa	cca	act	atc	ctt	gtg	3118
Leu	Ala	Val	Gln	Asn	Lys	Ser	Tyr	Asp	Lys	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	
1020						1025					1030				
gca	aag	agt	gtc	aag	gga	gag	gaa	gaa	ata	cca	gat	gga	gtt	gtt	3163
Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Ile	Pro	Asp	Gly	Val	Val	
1035						1040					1045				
ggt	gtt	att	aca	cct	gat	atg	cca	gat	gtt	ctc	tcc	cat	gta	tca	3208
Gly	Val	Ile	Thr	Pro	Asp	Met	Pro	Asp	Val	Leu	Ser	His	Val	Ser	
1050						1055					1060				
gtc	cga	gca	agg	aat	tgc	aag	gtt	tta	ttt	gca	aca	tgc	ttt	gat	3253
Val	Arg	Ala	Arg	Asn	Cys	Lys	Val	Leu	Phe	Ala	Thr	Cys	Phe	Asp	
1065						1070					1075				
cct	aac	acc	ttg	tct	gaa	ctc	caa	gga	cat	gat	ggg	aaa	gtg	ttt	3298
Pro	Asn	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	His	Asp	Gly	Lys	Val	Phe	
1080						1085					1090				
tcc	ttc	aaa	cct	act	tct	gca	gat	atc	acc	tat	agg	gag	att	cca	3343
Ser	Phe	Lys	Pro	Thr	Ser	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Glu	Ile	Pro	
1095						1100					1105				
gag	agt	gaa	ctg	caa	tca	ggt	tct	cta	aat	gca	gaa	gct	ggc	cag	3388
Glu	Ser	Glu	Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Leu	Asn	Ala	Glu	Ala	Gly	Gln	
1110						1115					1120				
gca	gtg	cca	tct	gtg	tca	tta	gtc	aag	aag	aag	ttt	ctt	gga	aaa	3433
Ala	Val	Pro	Ser	Val	Ser	Leu	Val	Lys	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Lys	
1125						1130					1135				
tat	gca	ata	tca	gca	gaa	gaa	ttc	tct	gag	gaa	atg	gtt	ggg	gcc	3478
Tyr	Ala	Ile	Ser	Ala	Glu	Glu	Phe	Ser	Glu	Glu	Met	Val	Gly	Ala	
1140						1145					1150				
aag	tct	cgc	aac	gta	gca	tac	ctc	aaa	gga	aaa	gta	ccc	tca	tgg	3523
Lys	Ser	Arg	Asn	Val	Ala	Tyr	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Trp	
1155						1160					1165				
gtt	ggt	gtc	cct	aca	tca	gtt	gcg	att	cca	ttt	ggg	acc	ttt	gag	3568
Val	Gly	Val	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Ile	Pro	Phe	Gly	Thr	Phe	Glu	
1170						1175					1180				
aag	gtt	ttg	tct	gat	gaa	atc	aat	aag	gaa	gtc	gcg	caa	acc	ata	3613
Lys	Val	Leu	Ser	Asp	Glu	Ile	Asn	Lys	Glu	Val	Ala	Gln	Thr	Ile	
1185						1190					1195				
caa	atg	ctg	aag	gga	aaa	ctt	gct	caa	gat	gat	ttt	agt	gct	cta	3658
Gln	Met	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Ala	Gln	Asp	Asp	Phe	Ser	Ala	Leu	
1200						1205					1210				
ggc	gaa	ata	cgg	aaa	act	gtt	ctc	aat	tta	act	gct	cct	act	caa	3703
Gly	Glu	Ile	Arg	Lys	Thr	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Gln	
1215						1220					1225				
ctg	atc	aag	gaa	ctg	aag	gag	aag	atg	cta	ggc	tct	gga	atg	ccc	3748
Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Lys	Glu	Lys	Met	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Pro	
1230						1235					1240				
tgg	cct	gga	gat	gaa	ggt	gac	caa	cgt	tgg	gag	caa	gca	tgg	atg	3793
Trp	Pro	Gly	Asp	Glu	Gly	Asp	Gln	Arg	Trp	Glu	Gln	Ala	Trp	Met	
1245						1250					1255				
gca	att	aaa	aag	gtt	tgg	gcg	tca	aaa	tgg	aat	gaa	aga	gca	tat	3838

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ala	Ile	Lys	Lys	Val	Trp	Ala	Ser	Lys	Trp	Asn	Glu	Arg	Ala	Tyr		
1260						1265					1270					
ttt	agc	act	cgt	aag	gtg	aag	ctt	gat	cat	gac	tac	ctt	tcc	atg		3883
Phe	Ser	Thr	Arg	Lys	Val	Lys	Leu	Asp	His	Asp	Tyr	Leu	Ser	Met		
1275						1280					1285					
gct	gta	ctt	gta	caa	gaa	att	gtc	aat	gca	gac	tat	gcc	ttt	gtc		3928
Ala	Val	Leu	Val	Gln	Glu	Ile	Val	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ala	Phe	Val		
1290						1295					1300					
att	cat	act	act	aac	cca	tca	tcg	gga	gat	tcg	tct	gag	ata	tat		3973
Ile	His	Thr	Thr	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Glu	Ile	Tyr		
1305						1310					1315					
gct	gaa	gtg	gtg	aaa	ggg	ctt	gga	gaa	aca	ctt	gta	gga	gcc	tat		4018
Ala	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Val	Gly	Ala	Tyr		
1320						1325					1330					
cct	ggt	cgc	gcc	atg	agc	ttt	gta	tgt	aag	aaa	aac	gac	ctt	gac		4063
Pro	Gly	Arg	Ala	Met	Ser	Phe	Val	Cys	Lys	Lys	Asn	Asp	Leu	Asp		
1335						1340					1345					
tct	ccc	aag	gta	ctg	ggt	ttc	cca	agc	aag	cca	att	ggt	gtc	ttc		4108
Ser	Pro	Lys	Val	Leu	Gly	Phe	Pro	Ser	Lys	Pro	Ile	Gly	Val	Phe		
1350						1355					1360					
ata	aag	aga	tca	atc	atc	ttt	cgt	tcg	gat	tcc	aac	ggt	gag	gat		4153
Ile	Lys	Arg	Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	Glu	Asp		
1365						1370					1375					
tta	gaa	ggg	tat	gct	gga	gca	aga	ctg	tat	gat	agt	gtc	cct	atg		4198
Leu	Glu	Gly	Tyr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Tyr	Asp	Ser	Val	Pro	Met		
1380						1385					1390					
gat	gag	gaa	gat	gaa	gtc	ata	gtc	gac	tac	aac	aac	gga	ccc	ctc		4243
Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Val	Ile	Val	Asp	Tyr	Asn	Asn	Gly	Pro	Leu		
1395						1400					1405					
att	aca	gat	cag	gga	ttc	caa	aaa	tcc	aac	ctc	ccg	agc	att	gca		4288
Ile	Thr	Asp	Gln	Gly	Phe	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Pro	Ser	Ile	Ala		
1410						1415					1420					
ccg	gct	ggt	cat	gcc	att	gag	gag	ctt	tat	ggg	tcc	cca	cag	gat		4333
Pro	Ala	Gly	His	Ala	Ile	Glu	Glu	Leu	Tyr	Gly	Ser	Pro	Gln	Asp		
1425						1430					1435					
gtt	gag	ggt	gca	gtg	aag	gaa	ggg	aag	cta	tac	gta	gta	cag	aca		4378
Val	Glu	Gly	Ala	Val	Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	Tyr	Val	Val	Gln	Thr		
1440						1445					1450					
aga	cca	cag	atg	taa	tctatatgta	tattttatag	ccaagtcaat	caggcaatgt								4433
Arg	Pro	Gln	Met													
1455																
tgtagagtaa	gatatacggg	ccgtgggaca	tgtataacac	gttacgccct	tttttttatt											4493
atttgcctttc	atactcacia	tacactaatt	tatagggctt	attttatcgc	caaaaaaaaa											4553
aaaaaaaaaga	aaaaaaaaaaa	aaa														4576

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 1457

&lt;212&gt; PRT

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
<213> oryza sativa

<400> 13

Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu  
1 5 10 15

Gly Leu Gly Val His Ala Arg Pro Ala Ser Pro Ser Pro Ala Leu Leu  
20 25 30

Pro Pro Ala Ala Leu Arg Arg Gly Arg Arg Leu Pro Ala Ala Thr Thr  
35 40 45

Thr Leu Ala Val Ser Arg Arg Ser Leu Leu Ala Pro Arg Ala Ile Ala  
50 55 60

Ala Ser Thr Gly Arg Ala Ser Pro Gly Leu Val Gly Arg Phe Thr Leu  
65 70 75 80

Asp Ala Asn Ser Glu Leu Lys Val Thr Leu Asn Pro Ala Pro Gln Gly  
85 90 95

Ser Val Val Glu Ile Asn Leu Glu Ala Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu  
100 105 110

Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Arg Gly Glu Trp Leu Leu  
115 120 125

Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu  
130 135 140

Arg Thr Pro Phe Ile Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Lys Ile Glu  
145 150 155 160

Ile Asp Asp Pro Ala Val Gln Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu  
165 170 175

Ala Arg Asn Asn Trp Tyr Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Ile Gln  
180 185 190

Leu Gln Ala Ser Gln Tyr Gln Gly Gln Gly Thr Ser Thr Ala Thr Ser  
195 200 205

Ser Thr Val Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr Leu Arg  
210 215 220

Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu  
225 230 235 240

Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Glu Leu Ile Glu Glu Leu Asn Lys Gly  
245 250 255

Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Thr Pro Glu Ala  
 260 265 270  
 Thr Asp Ser Asn Ala Pro Ala Ser Glu Ser Thr Val Thr Thr Lys Val  
 275 280 285  
 Pro Glu Glu Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys Ala  
 290 295 300  
 Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe Glu Glu  
 305 310 315  
 Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ser Glu Leu Asp Lys Gly Thr Ser Val Glu  
 325 330 335  
 Gln Leu Arg Asn Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Thr Lys Val Ser  
 340 345 350  
 Lys Gln Leu Lys Asp Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile Gln Arg  
 355 360 365  
 Lys Lys Arg Asp Ile Val Gln Leu Leu Lys Lys His Lys Pro Thr Val  
 370 375 380  
 Met Glu Ala Gln Val Glu Thr Pro Lys Gln Pro Thr Val Leu Asp Leu  
 385 390 395 400  
 Phe Thr Lys Ser Leu Gln Glu Gln Asp Asn Cys Glu Val Leu Ser Arg  
 405 410 415  
 Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Gly Ile Thr Thr Val  
 420 425 430  
 Ala Leu Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asn Tyr Met Glu Pro  
 435 440 445  
 Leu Ile Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Glu Asn Gly Glu Trp Gln Ala  
 450 455 460  
 Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Ser Gly Ser Ser Leu Leu Asp Lys Ala  
 465 470 475 480  
 Cys Glu Thr Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Leu Asn Gly Leu His Cys Gln  
 485 490 495  
 Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Arg Met Pro Phe  
 500 505 510  
 Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Met Lys Asn Asn Gly Ser Asp Phe  
 515 520 525



Tyr Leu Asp Phe Ser Thr Lys Val Ala Lys Asn Thr Lys Asp Thr Gly  
 530 535 540  
 Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Glu Ala Leu Leu Glu Arg Ile Ala Asp  
 545 550 555 560  
 Leu Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala  
 565 570 575  
 Ala Asp Leu Val Asp Gln Ala Arg Asp Asn Gly Leu Leu Gly Ile Ile  
 580 585 590  
 Gly Ile Phe Val Trp Ile Gly Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp  
 595 600 605  
 Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp  
 610 615 620  
 Arg Phe Thr Asp Asp Leu Glu Asn Met Tyr Arg Thr Tyr Pro Gln Tyr  
 625 630 635 640  
 Gln Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Ala Val Gly Arg Gly Gly Glu  
 645 650 655  
 Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg  
 660 665 670  
 Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu  
 675 680 685  
 His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Leu  
 690 695 700  
 Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Thr Gly Val Tyr Trp Asp Thr Leu  
 705 710 715 720  
 Lys Lys Gly Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Pro  
 725 730 735  
 Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Asp Ser Leu Leu  
 740 745 750  
 Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly  
 755 760 765  
 Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Thr Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu  
 770 775 780  
 Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu  
 785 790 795 800

Pro Ser Gly Phe Pro Lys Leu Leu Glu Phe Ile Leu Asp His Val Glu  
805 810 815

Asp Lys Ser Ala Arg Pro Leu Leu Gly Gly Leu Leu Glu Ala Arg Ala  
820 825 830

Glu Leu His Pro Leu Leu Leu Gly Ser Pro Glu Arg Met Lys Asp Leu  
835 840 845

Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Val Glu  
850 855 860

Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Val Glu Pro Glu Lys Ile Met Tyr  
865 870 875 880

Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Thr Asp Asp Asn  
885 890 895

Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Val Glu Met  
900 905 910

Ala Lys Gln Lys Asn Asn Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu  
915 920 925

Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr Tyr Asn  
930 935 940

Leu Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Asn Ile Asp  
945 950 955 960

Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser  
965 970 975

Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Leu Asn Arg Ile Asp Pro Val Leu Arg  
980 985 990

Asn Val Ala Gln Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val  
995 1000 1005

Ser Gly Tyr Ile Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn  
1010 1015 1020

Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys  
1025 1030 1035

Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro  
1040 1045 1050

Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn  
1055 1060 1065

Cys Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Thr Leu Ser  
 1070 1075 1080  
 Glu Leu Gln Gly His Asp Gly Lys Val Phe Ser Phe Lys Pro Thr  
 1085 1090 1095  
 Ser Ala Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Ile Pro Glu Ser Glu Leu Gln  
 1100 1105 1110  
 Ser Gly Ser Leu Asn Ala Glu Ala Gly Gln Ala Val Pro Ser Val  
 1115 1120 1125  
 Ser Leu Val Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala  
 1130 1135 1140  
 Glu Glu Phe Ser Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Val  
 1145 1150 1155  
 Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr  
 1160 1165 1170  
 Ser Val Ala Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp  
 1175 1180 1185  
 Glu Ile Asn Lys Glu Val Ala Gln Thr Ile Gln Met Leu Lys Gly  
 1190 1195 1200  
 Lys Leu Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys  
 1205 1210 1215  
 Thr Val Leu Asn Leu Thr Ala Pro Thr Gln Leu Ile Lys Glu Leu  
 1220 1225 1230  
 Lys Glu Lys Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu  
 1235 1240 1245  
 Gly Asp Gln Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val  
 1250 1255 1260  
 Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys  
 1265 1270 1275  
 Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln  
 1280 1285 1290  
 Glu Ile Val Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn  
 1295 1300 1305  
 Pro Ser Ser Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys  
 1310 1315 1320

Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met  
1325 1330 1335

Ser Phe Val Cys Lys Lys Asn Asp Leu Asp Ser Pro Lys Val Leu  
1340 1345 1350

Gly Phe Pro Ser Lys Pro Ile Gly Val Phe Ile Lys Arg Ser Ile  
1355 1360 1365

Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala  
1370 1375 1380

Gly Ala Arg Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu  
1385 1390 1395

Val Ile Val Asp Tyr Asn Asn Gly Pro Leu Ile Thr Asp Gln Gly  
1400 1405 1410

Phe Gln Lys Ser Asn Leu Pro Ser Ile Ala Pro Ala Gly His Ala  
1415 1420 1425

Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln Asp Val Glu Gly Ala Val  
1430 1435 1440

Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met  
1445 1450 1455

<210> 14

<211> 4745

<212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<221> CDS

<222> (103)..(4482)

<223>

<300>

<308> NCBI / AR400815

<309> 2003-12-18

<400> 14

gcaccagcct ctccccattt tcacgtgatt cccaatctca cactcttctc acaccttcaa  
Seite 67

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ccgattcaac gcaacaaagt gataaagtgt ggatccggga ag	atg agc cag agt	114
	Met Ser Gln Ser	
	1	
atc ttc cac cag acg gtg ctt tgt caa acg caa acg gtt gcg gag cat		162
Ile Phe His Gln Thr Val Leu Cys Gln Thr Gln Thr Val Ala Glu His		
5 10 15 20		
caa agt aag gtt agt tcc ttg gag gtg agt gcg aac aaa gga aag aag		210
Gln Ser Lys Val Ser Ser Leu Glu Val Ser Ala Asn Lys Gly Lys Lys		
25 30 35		
aac ctc ttt ttg gct cct aca aat ttt cgc ggg agc agg ctg tgt gtg		258
Asn Leu Phe Leu Ala Pro Thr Asn Phe Arg Gly Ser Arg Leu Cys Val		
40 45 50		
agg aaa cgc aaa tta acc atg gga agg cac cac cac cgc cac gtt gac		306
Arg Lys Arg Lys Leu Thr Met Gly Arg His His His Arg His Val Asp		
55 60 65		
gct gtt cca cgc gct gtt tta acc acc aat ctg gct tct gag ctt tct		354
Ala Val Pro Arg Ala Val Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser Glu Leu Ser		
70 75 80		
ggg aag ttc aac ctt gac gga aat att gag ttg cag att gct gtt agt		402
Gly Lys Phe Asn Leu Asp Gly Asn Ile Glu Leu Gln Ile Ala Val Ser		
85 90 95 100		
tct tca gaa cca gga gct gca aga caa gta gat ttt aag gtt tca tat		450
Ser Ser Glu Pro Gly Ala Ala Arg Gln Val Asp Phe Lys Val Ser Tyr		
105 110 115		
aat agt gag tct ctg ctt tta cat tgg gga gtt gtg cgt gat cag cca		498
Asn Ser Glu Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Val Val Arg Asp Gln Pro		
120 125 130		
ggg aag tgg gtt ctt cct tct cgt cac cca gat gga act aaa aat tat		546
Gly Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg His Pro Asp Gly Thr Lys Asn Tyr		
135 140 145		
aag agc aga gct ctt aga act cct ttt gtg aaa tcc gac tca gga tct		594
Lys Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Asp Ser Gly Ser		
150 155 160		
ttc ctt aaa ata gaa att gac gat cct gct gca caa gcc att gag ttc		642
Phe Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ala Gln Ala Ile Glu Phe		
165 170 175 180		
ctc ata ctt gat gag gct aag aat aag tgg ttt aag aat aat ggt gag		690
Leu Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Glu		
185 190 195		
aac ttt cac atc aag tta cca gta aaa agc aag cta tct caa gaa gtt		738
Asn Phe His Ile Lys Leu Pro Val Lys Ser Lys Leu Ser Gln Glu Val		
200 205 210		
tca gtt cct gaa gac ctt gta cag att caa gca tat ctt agg tgg gaa		786
Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu		
215 220 225		
cga aag ggt aag cag atg tac act cca gag caa gag aag gag gaa tat		834
Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr		
230 235 240		
gaa gca gct cgg aat gaa cta ttg gag gaa gta gcc agg ggt act tct		882
Glu Ala Ala Arg Asn Glu Leu Leu Glu Glu Val Ala Arg Gly Thr Ser		
245 250 255 260		

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtg cga gat ctc cat gca agg tta act aag aaa act aaa gct gcc gaa Val Arg Asp Leu His Ala Arg Leu Thr Lys Lys Thr Lys Ala Ala Glu 265 270 275	930
gta aag gag cct tct gtt tct gaa aca aag acc atc cct gat gaa ctt Val Lys Glu Pro Ser Val Ser Glu Thr Lys Thr Ile Pro Asp Glu Leu 280 285 290	978
gta cag att caa gct ttt ata cga tgg gaa aaa gct ggg aag cct aac Val Gln Ile Gln Ala Phe Ile Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn 295 300 305	1026
tac tct cgg gaa caa caa ctt atg gaa ttt gag gaa gca aga aaa gaa Tyr Ser Arg Glu Gln Gln Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala Arg Lys Glu 310 315 320	1074
ttg tta gaa gag ctt gag aag ggg gct tct ctg gat gcg ata cgg aag Leu Leu Glu Glu Leu Glu Lys Gly Ala Ser Leu Asp Ala Ile Arg Lys 325 330 335 340	1122
aag att gtc aaa gga gag ata caa act aaa gtt gcc aag caa ttg aaa Lys Ile Val Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ala Lys Gln Leu Lys 345 350 355	1170
acc aaa aaa tac ttt cgt gct gaa aga ata cag agg aaa aag aga gat Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Ala Glu Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp 360 365 370	1218
ttg atg cag ctt atc aac cga aat gtt gca caa aat ata gtt gaa caa Leu Met Gln Leu Ile Asn Arg Asn Val Ala Gln Asn Ile Val Glu Gln 375 380 385	1266
gtt ata gat gct cca aaa gcc ttg aca gta att gaa cat tat gcc aat Val Ile Asp Ala Pro Lys Ala Leu Thr Val Ile Glu His Tyr Ala Asn 390 395 400	1314
gca agg gaa gaa tat gaa agt ggt cct gtt ttg aat aag aca ata tac Ala Arg Glu Glu Tyr Glu Ser Gly Pro Val Leu Asn Lys Thr Ile Tyr 405 410 415 420	1362
aag ctt ggt gat aat tat ctt ctg gtc ctt gtt acc aag gat gct ggc Lys Leu Gly Asp Asn Tyr Leu Leu Val Leu Val Thr Lys Asp Ala Gly 425 430 435	1410
aag att aag gtt cac cta gct aca gac tcg aaa aaa cct ttt aca ctt Lys Ile Lys Val His Leu Ala Thr Asp Ser Lys Lys Pro Phe Thr Leu 440 445 450	1458
cac tgg gcc tta tct aga aca tct gaa gag tgg ttg gta cca cct gaa His Trp Ala Leu Ser Arg Thr Ser Glu Glu Trp Leu Val Pro Pro Glu 455 460 465	1506
act gct ctg ccc cct gga tct gtt act atg aat gag gcc gct gaa aca Thr Ala Leu Pro Pro Gly Ser Val Thr Met Asn Glu Ala Ala Glu Thr 470 475 480	1554
cct ttc aaa gct ggt tct tcg tct cat cct tct tat gag gtc cag tcc Pro Phe Lys Ala Gly Ser Ser Ser His Pro Ser Tyr Glu Val Gln Ser 485 490 495 500	1602
ttg gat ata gag gtt gat gat gat act ttt aaa gga ata cct ttt gtc Leu Asp Ile Glu Val Asp Asp Asp Thr Phe Lys Gly Ile Pro Phe Val 505 510 515	1650
att ctg tcg gat gga gaa tgg ata aag aac aat gga tca aat ttt tat Ile Leu Ser Asp Gly Glu Trp Ile Lys Asn Asn Gly Ser Asn Phe Tyr 520 525 530	1698

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

att gaa ttt ggt ggg aag aag cag aaa cag aag gat ttt ggc aat ggc Ile Glu Phe Gly Gly Lys Lys Gln Lys Gln Lys Asp Phe Gly Asn Gly 535 540 545	1746
aaa ggt aca gcc aag ttc ttg ttg aat aaa ata gca gaa atg gaa agt Lys Gly Thr Ala Lys Phe Leu Leu Asn Lys Ile Ala Glu Met Glu Ser 550 555 560	1794
gag gca caa aag tcc ttc atg cat cga ttt aac att gca tca gat ttg Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ser Asp Leu 565 570 575 580	1842
ata gat gaa gcc aaa aat gct ggt caa ctg ggt ctt gcg ggg att ttg Ile Asp Glu Ala Lys Asn Ala Gly Gln Leu Gly Leu Ala Gly Ile Leu 585 590 595	1890
gtg tgg atg aga ttc atg gct aca agg cag ctc ata tgg aac aaa aat Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn 600 605 610	1938
tac aat gtg aag cca cgt gag ata agt aaa gca cag gat agg ctt aca Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr 615 620 625	1986
gac ttg ctc caa gat gtt tat gca aat tat cca cag tat agg gaa att Asp Leu Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile 630 635 640	2034
gtg agg atg atc ttg tcc act gtt ggt cgt gga ggt gaa gga gat gtc Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val 645 650 660	2082
gga cag agg att cgg gat gaa atc ctt gtt atc cag aga aat aat gat Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp 665 670 675	2130
tgc aaa ggt gga atg atg gag gaa tgg cac cag aaa tta cac aat aat Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn 680 685 690	2178
act agt cct gat gat gtt gta atc tgt cag gca cta att gat tat ata Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile 695 700 705	2226
aat agt gac ttt gat att ggt gtt tac tgg aaa gca ttg aat gac aat Asn Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Lys Ala Leu Asn Asp Asn 710 715 720	2274
aga ata aca aaa gag cgg ctt ctg agc tat gac cgt gcc atc cat tct Arg Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser 725 730 735 740	2322
gaa cca aat ttt agg aga gat cag aag gaa ggt ctt ctg cga gat ctg Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Glu Gly Leu Leu Arg Asp Leu 745 750 755	2370
gga aac tac atg agg act tta aag gca gtt cat tcc ggt gca gat ctt Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu 760 765 770	2418
gaa tct gct att tca aat tgt atg ggc tac aaa tct gag ggt cag ggc Glu Ser Ala Ile Ser Asn Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Gln Gly 775 780 785	2466
ttc atg gta ggg gtg aag ata aat cca gtg ccg ggt ttg cct act ggt Phe Met Val Gly Val Lys Ile Asn Pro Val Pro Gly Leu Pro Thr Gly 790 795 800	2514

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttt cca gaa tta ctt gag ttt gtc atg gaa cac gtt gaa gag aag aat	2562
Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val Met Glu His Val Glu Glu Lys Asn	
805 810 815 820	
ggt gaa cca ctt ctt gag ggg ttg ctt gag gct cgt cag gaa ctc caa	2610
Val Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Gln Glu Leu Gln	
825 830 835	
cca tca ctc agt aaa tcc caa agt cgt ctg aaa gat ctt ata ttt ttg	2658
Pro Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ser Arg Leu Lys Asp Leu Ile Phe Leu	
840 845 850	
gat gtt gcc ctt gat tct aca gtt aga aca gca gtg gaa agg agt tat	2706
Asp Val Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Ser Tyr	
855 860 865	
gag gaa tta aac aat gct gga cct gag aaa ata atg tac ttc att agc	2754
Glu Glu Leu Asn Asn Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser	
870 875 880	
ttg gtt ctt gaa aat ctc gca ctt tca tcg gat gac aat gaa gat ctt	2802
Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ser Asp Asp Asn Glu Asp Leu	
885 890 895 900	
atc tac tgt ttg aag gga tgg gat gtt gcc tta agc atg tgc aag att	2850
Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asp Val Ala Leu Ser Met Cys Lys Ile	
905 910 915	
aaa gat act cat tgg gca ttg tac gca aaa tca gtc ctt gac aga acc	2898
Lys Asp Thr His Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Val Leu Asp Arg Thr	
920 925 930	
cgt ctt gca cta aca aac aag gct cat tta tac cag gaa att ctg caa	2946
Arg Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ala His Leu Tyr Gln Glu Ile Leu Gln	
935 940 945	
cca tcg gca gaa tat ctt gga tca ctg ctt ggc gtg gac aaa tgg gcc	2994
Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Gly Val Asp Lys Trp Ala	
950 955 960	
gtg gaa ata ttt act gaa gaa att atc cgt gct gga tct gct gct tct	3042
Val Glu Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser	
965 970 975 980	
ttg tct act ctt cta aat cga ctg gat cct gtg ctc cga aag aca gct	3090
Leu Ser Thr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala	
985 990 995	
cat ctt gga agc tgg cag gtt att agt cca gtt gaa act gtt gga	3135
His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Thr Val Gly	
1000 1005 1010	
tat gtt gag gtt gta gat gag ttg ctt act gtt caa aac aaa tca	3180
Tyr Val Glu Val Val Asp Glu Leu Leu Thr Val Gln Asn Lys Ser	
1015 1020 1025	
tat gag cga cct aca att ttg ata gcc aat agt gtg aaa gga gag	3225
Tyr Glu Arg Pro Thr Ile Leu Ile Ala Asn Ser Val Lys Gly Glu	
1030 1035 1040	
gaa gaa att cca gat ggt aca gtt gct gtc ctg aca cct gat atg	3270
Glu Glu Ile Pro Asp Gly Thr Val Ala Val Leu Thr Pro Asp Met	
1045 1050 1055	
cct gat gtc cta tcc cat gtt tct gta cga gca aga aat agc aag	3315
Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys	
1060 1065 1070	



## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtg tgt ttt gct Val Cys Phe 1075	aca tgc ttt gat Thr Cys Phe Asp 1080	ccc aat atc ctg gct aac ctc Pro Asn Ile Leu Ala Asn Leu 1085	3360
caa gaa tat aaa Gln Glu Tyr Lys 1090	gga aag ctt tta Gly Lys Leu Leu 1095	cgc tta aag cct aca tct gct Arg Leu Lys Pro Thr Ser Ala 1100	3405
gat gta gtt tat Asp Val Val Tyr 1105	agt gag gtg aag Ser Glu Val Lys 1110	gag ggt gag ttt att gat gac Glu Gly Glu Phe Ile Asp Asp 1115	3450
aaa tca act caa Lys Ser Thr Gln 1120	ctg aaa gat gtt Leu Lys Asp Val 1125	ggg tct gtg tca ccc ata tct Gly Ser Val Ser Pro Ile Ser 1130	3495
ctg gcc aga aag Leu Ala Arg Lys 1135	aag ttt agt ggt Lys Phe Ser Gly 1140	aga tat gct gtc tca tct gaa Arg Tyr Ala Val Ser Ser Glu 1145	3540
gaa ttc act ggt Glu Phe Thr Gly 1150	gaa atg gtt gga Glu Met Val Gly 1155	gct aaa tct cgt aat atc tct Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ser 1160	3585
tat tta aaa ggg Tyr Leu Lys Gly 1165	aaa gta gct tct Lys Val Ala Ser 1170	tgg att gga att cct acc tca Trp Ile Gly Ile Pro Thr Ser 1175	3630
gtt gcc ata cca Val Ala Ile Pro 1180	ttt gga gtt ttt Phe Gly Val Phe 1185	gaa cat gtt ctt tct gat aaa Glu His Val Leu Ser Asp Lys 1190	3675
cca aac cag gca Pro Asn Gln Ala 1195	gtg gct gag agg Val Ala Glu Arg 1200	gtc aat aat ttg aaa aag aag Val Asn Asn Leu Lys Lys Lys 1205	3720
tta act gag gga Leu Thr Glu Gly 1210	gac ttc agt gtt Asp Phe Ser Val 1215	ctc aag gag att cgt gaa aca Leu Lys Glu Ile Arg Glu Thr 1220	3765
gtt cta cag ttg Val Leu Gln Leu 1225	aat gca cca tcc Asn Ala Pro Ser 1230	cag ttg gta gag gag ttg aaa Gln Leu Val Glu Glu Leu Lys 1235	3810
act aaa atg aag Thr Lys Met Lys 1240	agt tct gga atg Ser Ser Gly Met 1245	ccg tgg ccg ggt gat gaa ggt Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly 1250	3855
gaa caa cga tgg Glu Gln Arg Trp 1255	gaa caa gct tgg Glu Gln Ala Trp 1260	ata gct ata aaa aag gtg tgg Ile Ala Ile Lys Lys Val Trp 1265	3900
ggc tca aag tgg Gly Ser Lys Trp 1270	aat gaa aga gca Asn Glu Arg Ala 1275	tac ttc agc aca aga aaa gtg Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val 1280	3945
aaa ctc gac cac Lys Leu Asp His 1285	gaa tat ctt tcc Glu Tyr Leu Ser 1290	atg gca gtc ctg gtt cag gaa Met Ala Val Leu Val Gln Glu 1295	3990
gtg ata aat gct Val Ile Asn Ala 1300	gac tat gct ttt Asp Tyr Ala Phe 1305	gtc atc cac aca act aac cct Val Ile His Thr Thr Asn Pro 1310	4035
gcc tct gga gat Ala Ser Gly Asp 1315	tca tcg gaa ata Ser Ser Glu Ile 1320	tat gct gag gtg gta aag gga Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly 1325	4080

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ctt gga gaa aca	ctg gtt gga gct tat	cct ggt cgt gct ttg agt	4125
Leu Gly Glu Thr	Leu Val Gly Ala Tyr	Pro Gly Arg Ala Leu Ser	
1330	1335	1340	
ttt atc tgc aag	aaa cgt gat ttg aac	tct cct cag gtc ttg ggt	4170
Phe Ile Cys Lys	Lys Arg Asp Leu Asn	Ser Pro Gln Val Leu Gly	
1345	1350	1355	
tat cct agc aaa	cct gtc ggc cta ttt	ata aga cag tca att att	4215
Tyr Pro Ser Lys	Pro Val Gly Leu Phe	Ile Arg Gln Ser Ile Ile	
1360	1365	1370	
ttc cga tct gat	tcc aat ggt gaa gat	cta gaa ggt tat gct ggt	4260
Phe Arg Ser Asp	Ser Asn Gly Glu Asp	Leu Glu Gly Tyr Ala Gly	
1375	1380	1385	
gca ggt ctt tat	gac agt gtg cca atg	gat gaa gcc gag aag gtg	4305
Ala Gly Leu Tyr	Asp Ser Val Pro Met	Asp Glu Ala Glu Lys Val	
1390	1395	1400	
gtg ctt gat tat	tca tca gac aaa ctg	atc ctt gat ggt agt ttt	4350
Val Leu Asp Tyr	Ser Ser Asp Lys Leu	Ile Leu Asp Gly Ser Phe	
1405	1410	1415	
cgc cag tca atc	ttg tcc agc att gcc	cgt gca gga aat gaa att	4395
Arg Gln Ser Ile	Leu Ser Ser Ile Ala	Arg Ala Gly Asn Glu Ile	
1420	1425	1430	
gaa gag ttg tat	ggc act cct cag gac	att gaa ggt gtc atc aag	4440
Glu Glu Leu Tyr	Gly Thr Pro Gln Asp	Ile Glu Gly Val Ile Lys	
1435	1440	1445	
gat ggc aaa gtc	tat gtt gtc cag acc	aga cca caa atg taa	4482
Asp Gly Lys Val	Tyr Val Val Gln Thr	Arg Pro Gln Met	
1450	1455		
acttgcatcac	ccatgtcttc	taagccacct	acctcaacta
tggtcatccc	cgagcaacac	4542	
gtcgtttcaa	acgtggccgt	ggcagcttct	gtgagttcaa
gagtaacccc	cggattacca	4602	
aacatggcct	tatagattta	ttacatgata	tattgaaaat
taaggaataa	gtgtataaaa	4662	
acggaatatt	gtaaattaag	aaaaatttag	acggtcttat
atattctttt	tcctactat	4722	
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaa	4745

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1459

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Glycine max

&lt;400&gt; 15

Met Ser Gln Ser	Ile Phe His Gln Thr	Val Leu Cys Gln Thr	Gln Thr
1	5	10	15

Val Ala Glu His	Gln Ser Lys Val	Ser Ser Leu Glu Val	Ser Ala Asn
20	25	30	

Lys Gly Lys Lys Asn Leu Phe Leu Ala Pro Thr Asn Phe Arg Gly Ser  
 35 40 45  
 Arg Leu Cys Val Arg Lys Arg Lys Leu Thr Met Gly Arg His His His  
 50 55 60  
 Arg His Val Asp Ala Val Pro Arg Ala Val Leu Thr Thr Asn Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Leu Ser Gly Lys Phe Asn Leu Asp Gly Asn Ile Glu Leu Gln  
 85 90 95  
 Ile Ala Val Ser Ser Ser Glu Pro Gly Ala Ala Arg Gln Val Asp Phe  
 100 105 110  
 Lys Val Ser Tyr Asn Ser Glu Ser Leu Leu Leu His Trp Gly Val Val  
 115 120 125  
 Arg Asp Gln Pro Gly Lys Trp Val Leu Pro Ser Arg His Pro Asp Gly  
 130 135 140  
 Thr Lys Asn Tyr Lys Ser Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Gly Ser Phe Leu Lys Ile Glu Ile Asp Asp Pro Ala Ala Gln  
 165 170 175  
 Ala Ile Glu Phe Leu Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Lys Trp Phe Lys  
 180 185 190  
 Asn Asn Gly Glu Asn Phe His Ile Lys Leu Pro Val Lys Ser Lys Leu  
 195 200 205  
 Ser Gln Glu Val Ser Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr  
 210 215 220  
 Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Met Tyr Thr Pro Glu Gln Glu  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Asn Glu Leu Leu Glu Glu Val Ala  
 245 250 255  
 Arg Gly Thr Ser Val Arg Asp Leu His Ala Arg Leu Thr Lys Lys Thr  
 260 265 270  
 Lys Ala Ala Glu Val Lys Glu Pro Ser Val Ser Glu Thr Lys Thr Ile  
 275 280 285  
 Pro Asp Glu Leu Val Gln Ile Gln Ala Phe Ile Arg Trp Glu Lys Ala  
 290 295 300

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Gly Lys Pro Asn Tyr Ser Arg Glu Gln Gln Leu Met Glu Phe Glu Glu  
305 310 315 320

Ala Arg Lys Glu Leu Leu Glu Glu Leu Glu Lys Gly Ala Ser Leu Asp  
325 330 335

Ala Ile Arg Lys Lys Ile Val Lys Gly Glu Ile Gln Thr Lys Val Ala  
340 345 350

Lys Gln Leu Lys Thr Lys Lys Tyr Phe Arg Ala Glu Arg Ile Gln Arg  
355 360 365

Lys Lys Arg Asp Leu Met Gln Leu Ile Asn Arg Asn Val Ala Gln Asn  
370 375 380

Ile Val Glu Gln Val Ile Asp Ala Pro Lys Ala Leu Thr Val Ile Glu  
385 390 395 400

His Tyr Ala Asn Ala Arg Glu Glu Tyr Glu Ser Gly Pro Val Leu Asn  
405 410 415

Lys Thr Ile Tyr Lys Leu Gly Asp Asn Tyr Leu Leu Val Leu Val Thr  
420 425 430

Lys Asp Ala Gly Lys Ile Lys Val His Leu Ala Thr Asp Ser Lys Lys  
435 440 445

Pro Phe Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Arg Thr Ser Glu Glu Trp Leu  
450 455 460

Val Pro Pro Glu Thr Ala Leu Pro Pro Gly Ser Val Thr Met Asn Glu  
465 470 475 480

Ala Ala Glu Thr Pro Phe Lys Ala Gly Ser Ser Ser His Pro Ser Tyr  
485 490 495

Glu Val Gln Ser Leu Asp Ile Glu Val Asp Asp Asp Thr Phe Lys Gly  
500 505 510

Ile Pro Phe Val Ile Leu Ser Asp Gly Glu Trp Ile Lys Asn Asn Gly  
515 520 525

Ser Asn Phe Tyr Ile Glu Phe Gly Gly Lys Lys Gln Lys Gln Lys Asp  
530 535 540

Phe Gly Asn Gly Lys Gly Thr Ala Lys Phe Leu Leu Asn Lys Ile Ala  
545 550 555 560

Glu Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg Phe Asn Ile  
565 570 575

Ala Ser Asp Leu Ile Asp Glu Ala Lys Asn Ala Gly Gln Leu Gly Leu  
 580 585 590

Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile  
 595 600 605

Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln  
 610 615 620

Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asp Val Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln  
 625 630 635 640

Tyr Arg Glu Ile Val Arg Met Ile Leu Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly  
 645 650 655

Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln  
 660 665 670

Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys  
 675 680 685

Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu  
 690 695 700

Ile Asp Tyr Ile Asn Ser Asp Phe Asp Ile Gly Val Tyr Trp Lys Ala  
 705 710 715 720

Leu Asn Asp Asn Arg Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg  
 725 730 735

Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Arg Asp Gln Lys Glu Gly Leu  
 740 745 750

Leu Arg Asp Leu Gly Asn Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala Val His Ser  
 755 760 765

Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ser Asn Cys Met Gly Tyr Lys Ser  
 770 775 780

Glu Gly Gln Gly Phe Met Val Gly Val Lys Ile Asn Pro Val Pro Gly  
 785 790 795 800

Leu Pro Thr Gly Phe Pro Glu Leu Leu Glu Phe Val Met Glu His Val  
 805 810 815

Glu Glu Lys Asn Val Glu Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg  
 820 825 830

Gln Glu Leu Gln Pro Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ser Arg Leu Lys Asp  
 835 840 845

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Leu Ile Phe Leu Asp Val Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg Thr Ala Val  
 850 855 860

Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Gly Pro Glu Lys Ile Met  
 865 870 875 880

Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ser Asp Asp  
 885 890 895

Asn Glu Asp Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asp Val Ala Leu Ser  
 900 905 910

Met Cys Lys Ile Lys Asp Thr His Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ser Val  
 915 920 925

Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Thr Asn Lys Ala His Leu Tyr Gln  
 930 935 940

Glu Ile Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Gly Val  
 945 950 955 960

Asp Lys Trp Ala Val Glu Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly  
 965 970 975

Ser Ala Ala Ser Leu Ser Thr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu  
 980 985 990

Arg Lys Thr Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu  
 995 1000 1005

Thr Val Gly Tyr Val Glu Val Val Asp Glu Leu Leu Thr Val Gln  
 1010 1015 1020

Asn Lys Ser Tyr Glu Arg Pro Thr Ile Leu Ile Ala Asn Ser Val  
 1025 1030 1035

Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Thr Val Ala Val Leu Thr  
 1040 1045 1050

Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg  
 1055 1060 1065

Asn Ser Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu  
 1070 1075 1080

Ala Asn Leu Gln Glu Tyr Lys Gly Lys Leu Leu Arg Leu Lys Pro  
 1085 1090 1095

Thr Ser Ala Asp Val Val Tyr Ser Glu Val Lys Glu Gly Glu Phe  
 1100 1105 1110

Ile Asp 1115 Asp Lys Ser Thr Gln 1120 Leu Lys Asp Val Gly 1125 Ser Val Ser  
 Pro Ile 1130 Ser Leu Ala Arg Lys 1135 Lys Phe Ser Gly Arg 1140 Tyr Ala Val  
 Ser Ser 1145 Glu Glu Phe Thr Gly 1150 Glu Met Val Gly Ala 1155 Lys Ser Arg  
 Asn Ile 1160 Ser Tyr Leu Lys Gly 1165 Lys Val Ala Ser Trp 1170 Ile Gly Ile  
 Pro Thr 1175 Ser Val Ala Ile Pro 1180 Phe Gly Val Phe Glu 1185 His Val Leu  
 Ser Asp 1190 Lys Pro Asn Gln Ala 1195 Val Ala Glu Arg Val 1200 Asn Asn Leu  
 Lys Lys 1205 Lys Leu Thr Glu Gly 1210 Asp Phe Ser Val Leu 1215 Lys Glu Ile  
 Arg Glu 1220 Thr Val Leu Gln Leu 1225 Asn Ala Pro Ser Gln 1230 Leu Val Glu  
 Glu Leu 1235 Lys Thr Lys Met Lys 1240 Ser Ser Gly Met Pro 1245 Trp Pro Gly  
 Asp Glu 1250 Gly Glu Gln Arg Trp 1255 Glu Gln Ala Trp Ile 1260 Ala Ile Lys  
 Lys Val 1265 Trp Gly Ser Lys Trp 1270 Asn Glu Arg Ala Tyr 1275 Phe Ser Thr  
 Arg Lys 1280 Val Lys Leu Asp His 1285 Glu Tyr Leu Ser Met 1290 Ala Val Leu  
 Val Gln 1295 Glu Val Ile Asn Ala 1300 Asp Tyr Ala Phe Val 1305 Ile His Thr  
 Thr Asn 1310 Pro Ala Ser Gly Asp 1315 Ser Ser Glu Ile Tyr 1320 Ala Glu Val  
 Val Lys 1325 Gly Leu Gly Glu Thr 1330 Leu Val Gly Ala Tyr 1335 Pro Gly Arg  
 Ala Leu 1340 Ser Phe Ile Cys Lys 1345 Lys Arg Asp Leu Asn 1350 Ser Pro Gln  
 Val Leu 1355 Gly Tyr Pro Ser Lys 1360 Pro Val Gly Leu Phe 1365 Ile Arg Gln

Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly  
 1370 1375 1380

Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Ala  
 1385 1390 1395

Glu Lys Val Val Leu Asp Tyr Ser Ser Asp Lys Leu Ile Leu Asp  
 1400 1405 1410

Gly Ser Phe Arg Gln Ser Ile Leu Ser Ser Ile Ala Arg Ala Gly  
 1415 1420 1425

Asn Glu Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Thr Pro Gln Asp Ile Glu Gly  
 1430 1435 1440

Val Ile Lys Asp Gly Lys Val Tyr Val Val Gln Thr Arg Pro Gln  
 1445 1450 1455

Met

<210> 16

<211> 4846

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (158)..(4567)

<223>

<300>

<308> NCBI / AR400813

<309> 2003-12-18

<400> 16  
 ccacgcgtcc ggcttcatct tgctgatcgt gtccgtggct tcttgatact ccgtgactgt 60  
 ctccgtccga agcgagttag caagccgacc aacagcggct gagattcgct gcaacgtcgg 120  
 tatcaaaagg tgtccgagcg gttgagattc gcgtgcc atg tcc gga ttc agt gcc 175  
 Met Ser Gly Phe Ser Ala  
 1 5  
 gcg gcc aac gca gcg gcg gct gag cgg tgc gcg ctc gcg ttc cgc gca 223  
 Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys Ala Leu Ala Phe Arg Ala  
 10 15 20



## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cgg ccc gcg gcc tcc tcg cca gcg aag cgg cag cag cag ccg cag cca	271
Arg Pro Ala Ser Ser Pro Ala Lys Arg Gln Gln Gln Pro Gln Pro	
25 30 35	
gcg tcc ctc cga cgc agc ggg ggc cag cgc cgc ccc acg acg ctc tcc	319
Ala Ser Leu Arg Arg Ser Gly Gly Gln Arg Arg Pro Thr Thr Leu Ser	
40 45 50	
gcc tct agc cgc ggc ccc gtc gtg ccg cgc gcc gtc gcc acg tcc gcg	367
Ala Ser Ser Arg Gly Pro Val Val Pro Arg Ala Val Ala Thr Ser Ala	
55 60 65 70	
gac cgc gcg tcc ccc gac ctt atc gga aag ttc acg ctg gat tcc aac	415
Asp Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ile Gly Lys Phe Thr Leu Asp Ser Asn	
75 80 85	
tcc gag ctc cag gtc gca gtg aac cca gcg ccg cag ggt ttg gtg tca	463
Ser Glu Leu Gln Val Ala Val Asn Pro Ala Pro Gln Gly Leu Val Ser	
90 95 100	
gag att agc ctg gag gtg acc aac aca agc ggt tcc ctg att ttg cat	511
Glu Ile Ser Leu Glu Val Thr Asn Thr Ser Gly Ser Leu Ile Leu His	
105 110 115	
tgg gga gcc ctt cgc ccg gac aag aga gat tgg atc ctc ccg tcc aga	559
Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Lys Arg Asp Trp Ile Leu Pro Ser Arg	
120 125 130	
aaa cct gat gga acg aca gtg tac aag aac agg gct ctc agg aca cct	607
Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn Arg Ala Leu Arg Thr Pro	
135 140 145 150	
ttt gta aag tca ggt gat aac tcc act cta agg att gag ata gat gat	655
Phe Val Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu Arg Ile Glu Ile Asp Asp	
155 160 165	
cct ggg gtg cac gcc att gag ttc ctc atc ttt gac gag aca cag aac	703
Pro Gly Val His Ala Ile Glu Phe Leu Ile Phe Asp Glu Thr Gln Asn	
170 175 180	
aaa tgg ttt aaa aac aat ggc cag aat ttt cag gtt cag ttc cag tcg	751
Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe Gln Val Gln Phe Gln Ser	
185 190 195	
agc cgc cat cag ggt act ggt gca tct ggt gcc tcc tct tct gct act	799
Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ala Ser Ser Ser Ala Thr	
200 205 210	
tct acc ttg gtg cca gag gat ctt gtg cag atc caa gct tac ctt cgg	847
Ser Thr Leu Val Pro Glu Asp Leu Val Gln Ile Gln Ala Tyr Leu Arg	
215 220 225 230	
tgg gaa aga agg gga aag cag tca tac aca cca gag caa gaa aag gag	895
Trp Glu Arg Arg Gly Lys Gln Ser Tyr Thr Pro Glu Gln Glu Lys Glu	
235 240 245	
gag tat gaa gct gca cga gct gag tta ata gag gaa gta aac aga ggt	943
Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Glu Leu Ile Glu Glu Val Asn Arg Gly	
250 255 260	
gtt tct tta gag aag ctt cga gct aaa ttg aca aaa gca cct gaa gca	991
Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu Thr Lys Ala Pro Glu Ala	
265 270 275	
cct gag tcg gat gaa agt aaa tct tct gca tct cga atg ccc atc ggt	1039
Pro Glu Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser Arg Met Pro Ile Gly	
280 285 290	

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

aaa ctt cca gag gat ctt gta cag gtg cag gct tat ata agg tgg gag Lys Leu Pro Glu Asp Leu Val Gln Val Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu 295 300 305 310	1087
caa gcg ggc aag cca aac tat cct cct gag aag caa ctg gta gaa ttt Gln Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Leu Val Glu Phe 315 320 325	1135
gag gaa gca agg aag gaa ctg cag gct gag gtg gac aag gga atc tct Glu Glu Ala Arg Lys Glu Leu Gln Ala Glu Val Asp Lys Gly Ile Ser 330 335 340	1183
att gat cag ttg agg cag aaa att ttg aaa gga aac att gag agt aaa Ile Asp Gln Leu Arg Gln Lys Ile Leu Lys Gly Asn Ile Glu Ser Lys 345 350 355	1231
gtt tcc aag cag ctg aag aac aag aag tac ttc tct gta gaa agg att Val Ser 360 Lys Gln Leu Lys Asn Lys Lys Tyr Phe Ser Val Glu Arg Ile 365 370	1279
cag cgc aaa aag aga gat atc aca caa ctt ctc agt aaa cat aag cat Gln Arg Lys Lys Arg Asp Ile Thr Gln Leu Leu Ser Lys His Lys His 375 380 385 390	1327
aca ctt gtg gaa gat aaa gta gag gtt gta cca aaa caa cca act gtt Thr Leu Val Glu Asp 395 Lys Val Glu Val Pro Lys Gln Pro Thr Val 400 405	1375
ctt gat ctc ttc acc aag tct tta cat gag aag gat ggc tgt gaa gtt Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ser Leu His 415 Glu Lys Asp Gly Cys 420 Glu Val 410 425	1423
cta agc aga aag ctc ttc aag ttc ggc gat aaa gag ata ctg gca att Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp Lys Glu Ile Leu Ala Ile 425 430 435	1471
tct acc aag gtt caa aat aaa aca gaa gtt cac ttg gca aca aac cat Ser Thr 440 Lys Val Gln Asn Lys Thr Glu Val His 450 Ala Thr Asn His 445 455	1519
acc gac cca ctt att ctt cac tgg tct ttg gca aaa aat gct gga gaa Thr Asp Pro Leu Ile Leu His Trp Ser Leu Ala Lys Asn Ala Gly Glu 455 460 465 470	1567
tgg aag gca cct tct cca aat ata ttg cca tct ggt tcc aca ttg ctg Trp Lys Ala Pro Ser Pro Asn Ile Leu Pro Ser Gly Ser Thr Leu Leu 475 480 485	1615
gac aag gcg tgt gaa act gaa ttt act aaa tct gaa ttg gat ggt ttg Asp Lys Ala Cys 490 Glu Thr Glu Phe Thr Lys Ser Glu Leu Asp Gly Leu 495 500	1663
cat tac cag gtt gtt gag ata gag ctt gat gat gga gga tac aaa gga His Tyr Gln Val Val Glu Ile Glu Leu Asp Asp Gly Gly Tyr Lys Gly 505 510 515	1711
atg cca ttt gtt ctt cgg tct ggt gaa aca tgg aaa aaa aat aat ggt Met Pro Phe Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr Trp Lys Lys Asn Asn Gly 520 525 530	1759
tct gat ttt ttc cta gat ttc agc acc cat gat gtc aga aat att aag Ser Asp Phe Phe Leu Asp Phe Ser Thr His Asp Val Arg Asn Ile Lys 535 540 545 550	1807
tta aag ggc aat ggt gat gct ggt aaa ggt act gct aag gca ttg ctg Leu Lys Gly Asn Gly Asp Ala Gly Lys Gly Thr Ala Lys Ala Leu Leu 555 560 565	1855

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gag Glu	aga Arg	ata Ile	gca Ala 570	gat Asp	ctg Leu	gag Glu	gaa Glu	gat Asp 575	gcc Ala	cag Gln	cga Arg	tct Ser	ctt Leu 580	atg Met	cac His	1903
aga Arg	ttc Phe	aat Asn 585	att Ile	gca Ala	gca Ala	gat Asp	cta Leu 590	gct Ala	gac Asp	caa Gln	gcc Ala	aga Arg 595	gat Asp	gct Ala	gga Gly	1951
ctt Leu	ttg Leu 600	ggt Gly	att Ile	gtt Val	ggg Gly	ctt Leu 605	ttt Phe	gtt Val	tgg Trp	att Ile	aga Arg 610	ttc Phe	atg Met	gct Ala	acc Thr	1999
agg Arg 615	caa Gln	cta Leu	aca Thr	tgg Trp	aat Asn 620	aag Lys	aac Asn	tat Tyr	aat Asn	gtg Val 625	aag Lys	cca Pro	cgt Arg	gag Glu	ata Ile 630	2047
agc Ser	aaa Lys	gca Ala	cag Gln	gat Asp 635	agg Arg	ttt Phe	aca Thr	gat Asp	gat Asp 640	ctt Leu	gag Glu	aat Asn	atg Met	tac Tyr 645	aaa Lys	2095
gct Ala	tat Tyr	cca Pro	cag Gln 650	tac Tyr	aga Arg	gag Glu	ata Ile	tta Leu 655	aga Arg	atg Met	ata Ile	atg Met	gct Ala 660	gct Ala	gtt Val	2143
ggt Gly	cgc Arg	gga Gly 665	ggt Gly	gaa Glu	ggt Gly	gat Asp	gtt Val 670	ggt Gly	caa Gln	cgc Arg	att Ile	cgt Arg 675	gat Asp	gag Glu	ata Ile	2191
tta Leu 680	gta Val	ata Ile	cag Gln	aga Arg	aat Asn	aat Asn 685	gac Asp	tgc Cys	aaa Lys	ggt Gly	gga Gly 690	atg Met	atg Met	gaa Glu	gaa Glu	2239
tgg Trp 695	cac His	cag Gln	aaa Lys	ttg Leu	cac His 700	aac Asn	aat Asn	aca Thr	agc Ser	cca Pro 705	gat Asp	gat Asp	gta Val	gtg Val	ata Ile 710	2287
tgc Cys	cag Gln	gcc Ala	tta Leu	att Ile 715	gat Asp	tat Tyr	atc Ile	aag Lys	agt Ser 720	gac Asp	ttt Phe	gat Asp	ata Ile	agc Ser 725	gtt Val	2335
tac Tyr	tgg Trp	gac Asp	acc Thr 730	ttg Leu	aac Asn	aaa Lys	aat Asn	ggc Gly 735	ata Ile	acc Thr	aaa Lys	gag Glu	cgt Arg 740	ctc Leu	ttg Leu	2383
agc Ser	tat Tyr	gat Asp 745	cgt Arg	gct Ala	att Ile	cat His	tca Ser 750	gaa Glu	cca Pro	aat Asn	ttc Phe 755	aga Arg	agt Ser	gaa Glu	cag Gln	2431
aag Lys 760	gcg Ala	ggt Gly	tta Leu	ctc Leu	cgt Arg	gac Asp 765	ctg Leu	gga Gly	aat Asn	tac Tyr	atg Met 770	aga Arg	agc Ser	cta Leu	aag Lys	2479
gct Ala 775	gtg Val	cat His	tct Ser	ggt Gly	gct Ala 780	gat Asp	ctt Leu	gaa Glu	tct Ser	gct Ala 785	ata Ile	gca Ala	agt Ser	tgt Cys	atg Met 790	2527
gga Gly	tac Tyr	aaa Lys	tca Ser	gag Glu 795	ggt Gly	gaa Glu	ggt Gly	ttc Phe	atg Met 800	gtt Val	ggt Gly	gtt Val	cag Gln	atc Ile 805	aat Asn	2575
cca Pro	gtg Val	aag Lys	ggt Gly 810	tta Leu	cca Pro	tct Ser	gga Gly	ttt Phe 815	ccg Pro	gag Glu	ttg Leu	ctt Leu	gaa Glu 820	ttt Phe	gtg Val	2623
ctt Leu	gaa Glu	cat His 825	gtt Val	gag Glu	gat Asp	aaa Lys	tca Ser 830	gcg Ala	gaa Glu	cca Pro	ctt Leu	ctt Leu 835	gag Glu	ggg Gly	cta Leu	2671

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttg gaa gct cga gtt gaa ctg cgc cct ttg ctt ctt gat tcg cgt gaa Leu Glu Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Asp Ser Arg Glu 840 845 850	2719
cgc atg aaa gat ctt ata ttt ttg gac att gct ctt gat tct acc ttc Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Phe 855 860 865 870	2767
agg aca gca att gaa agg tca tat gag gag ctg aat gat gca gcc cca Arg Thr Ala Ile Glu Arg Ser Tyr Glu Glu Leu Asn Asp Ala Ala Pro 875 880 885	2815
gag aaa ata atg tac ttc atc agt ctt gtc ctt gaa aat ctt gcg ctt Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu 890 895 900	2863
tca att gac gac aat gaa gac atc ctg tat tgt tta aag gga tgg aac Ser Ile Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn 905 910 915	2911
caa gcc ttg gaa atg gct aag caa aaa gac gac caa tgg gcg ctc tat Gln Ala Leu Glu Met Ala Lys Gln Lys Asp Asp Gln Trp Ala Leu Tyr 920 925 930	2959
gct aaa gca ttt ctt gac aga aac aga ctt gcc ctt gcg agc aag gga Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Asn Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Gly 935 940 945 950	3007
gaa caa tac cat aat atg atg cag ccc tct gct gag tat ctt ggc tcg Glu Gln Tyr His Asn Met Met Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser 955 960 965	3055
tta ctc agc ata gac caa tgg gca gtc aat atc ttc aca gaa gaa att Leu Leu Ser Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile 970 975 980	3103
ata cgc ggt gga tca gct gct act ctg tct gct ctt ctg aac cga ttt Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Asn Arg Phe 985 990 995	3151
gat cct gtt tta agg aat gtt gct cac ctc gga agt tgg cag gtt Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu Gly Ser Trp Gln Val 1000 1005 1010	3196
ata agc ccg gtt gaa gta tca ggt tat gtg gtt gtg gtt gat gag Ile Ser Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu 1015 1020 1025	3241
tta ctt gct gtc cag aac aaa tct tat gat aaa cca acc atc ctt Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp Lys Pro Thr Ile Leu 1030 1035 1040	3286
gtg gca aag agt gtc aag gga gag gaa gaa ata cca gat gga gta Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Val 1045 1050 1055	3331
ggt ggt gta att aca cct gat atg cca gat gtt ctg tct cat gtg Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val 1060 1065 1070	3376
tca gtc cga gca agg aat agc aag gta ctg ttt gcg acc tgt ttt Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys Val Leu Phe Ala Thr Cys Phe 1075 1080 1085	3421
gac cac acc act cta tct gaa ctt gaa gga tat gat cag aaa ctg Asp His Thr Thr Leu Ser Glu Leu Glu Gly Tyr Asp Gln Lys Leu 1090 1095 1100	3466

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ttt Phe	tcc Ser 1105	ttc Phe	aag Lys	cct Pro	act Thr	tct Ser 1110	gca Ala	gat Asp	ata Ile	acc Thr	tat Tyr 1115	agg Arg	gag Glu	atc Ile	3511
aca Thr	gag Glu 1120	agt Ser	gaa Glu	ctt Leu	cag Gln	caa Gln 1125	tca Ser	agt Ser	tct Ser	cca Pro	aat Asn 1130	gca Ala	gaa Glu	gtt Val	3556
ggc Gly	cat His 1135	gca Ala	gta Val	cca Pro	tct Ser	att Ile 1140	tca Ser	ttg Leu	gcc Ala	aag Lys	aag Lys 1145	aaa Lys	ttt Phe	ctt Leu	3601
gga Gly	aaa Lys 1150	tat Tyr	gca Ala	ata Ile	tca Ser	gcc Ala 1155	gaa Glu	gaa Glu	ttc Phe	tct Ser	gag Glu 1160	gaa Glu	atg Met	gtt Val	3646
ggg Gly	gcc Ala 1165	aag Lys	tct Ser	cgg Arg	aat Asn	ata Ile 1170	gca Ala	tac Tyr	ctc Leu	aaa Lys	gga Gly 1175	aaa Lys	gta Val	cct Pro	3691
tca Ser	tgg Trp 1180	gtc Val	ggt Gly	gtc Val	cca Pro	acg Thr 1185	tca Ser	gtt Val	gcg Ala	ata Ile	cca Pro 1190	ttt Phe	ggc Gly	act Thr	3736
ttt Phe	gag Glu 1195	aag Lys	gtt Val	ttg Leu	tca Ser	gat Asp 1200	ggg Gly	ctt Leu	aat Asn	aag Lys	gaa Glu 1205	gta Val	gca Ala	cag Gln	3781
agc Ser	ata Ile 1210	gag Glu	aag Lys	ctt Leu	aag Lys	atc Ile 1215	aga Arg	ctt Leu	gcc Ala	caa Gln	gaa Glu 1220	gat Asp	ttt Phe	agt Ser	3826
gct Ala	cta Leu 1225	ggt Gly	gaa Glu	ata Ile	aga Arg	aaa Lys 1230	gtc Val	gtc Val	ctt Leu	aat Asn	ctt Leu 1235	act Thr	gct Ala	cct Pro	3871
atg Met	caa Gln 1240	ttg Leu	gtt Val	aat Asn	gag Glu	ctg Leu 1245	aag Lys	gag Glu	agg Arg	atg Met	cta Leu 1250	ggc Gly	tct Ser	gga Gly	3916
atg Met	ccc Pro 1255	tgg Trp	cct Pro	ggt Gly	gat Asp	gaa Glu 1260	gga Gly	gac Asp	aag Lys	cgt Arg	tgg Trp 1265	gag Glu	caa Gln	gca Ala	3961
tgg Trp	atg Met 1270	gct Ala	att Ile	aaa Lys	aag Lys	gtt Val 1275	tgg Trp	gca Ala	tca Ser	aaa Lys	tgg Trp 1280	aac Asn	gaa Glu	aga Arg	4006
gca Ala	tat Tyr 1285	ttt Phe	agc Ser	aca Thr	cgc Arg	aag Lys 1290	gtg Val	aaa Lys	ctt Leu	gat Asp	cat His 1295	gag Glu	tac Tyr	ctt Leu	4051
tcg Ser	atg Met 1300	gct Ala	gtt Val	ctc Leu	gtg Val	caa Gln 1305	gaa Glu	gtt Val	gtg Val	aat Asn	gca Ala 1310	gat Asp	tat Tyr	gct Ala	4096
ttt Phe	gtc Val 1315	att Ile	cat His	acc Thr	aca Thr	aac Asn 1320	cca Pro	tcg Ser	tct Ser	gga Gly	gat Asp 1325	tct Ser	tct Ser	gag Glu	4141
ata Ile	tat Tyr 1330	gct Ala	gaa Glu	gtg Val	gtg Val	aaa Lys 1335	ggg Gly	ctt Leu	ggc Gly	gag Glu	acc Thr 1340	ctc Leu	gtg Val	gga Gly	4186
gcc Ala	tat Tyr 1345	cct Pro	ggt Gly	cgt Arg	gct Ala	atg Met 1350	agc Ser	ttt Phe	gtt Val	tgc Cys	aaa Lys 1355	aaa Lys	gat Asp	gac Asp	4231

## BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 &amp; R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ctt gac tct ccc aag tta ctt ggt tac cca agc aag cca att ggt	4276
Leu Asp Ser Pro Lys Leu Leu Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly	
1360	1370
ctc ttc ata agg caa tca atc atc ttc cgt tcc gac tcc aac ggt	4321
Leu Phe Ile Arg Gln Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly	
1375	1385
gag gac ctg gaa ggt tat gct gga gca gga tta tat gat agt gta	4366
Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Val	
1390	1400
ccg atg gat gag gag gat gag gtt gta ctt gat tat aca act gac	4411
Pro Met Asp Glu Glu Asp Glu Val Val Leu Asp Tyr Thr Thr Asp	
1405	1415
cct ctt ata gta gac cgt gga ttc cga agc tca atc ctc tca agc	4456
Pro Leu Ile Val Asp Arg Gly Phe Arg Ser Ser Ile Leu Ser Ser	
1420	1430
ata gca cgg gct ggc cat gcc atc gag gag cta tat ggt tct cct	4501
Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro	
1435	1445
cag gac gtc gag gga gta gtg aag gat gga aaa atc tat gta gtc	4546
Gln Asp Val Glu Gly Val Val Lys Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val	
1450	1460
cag aca aga cca cag atg tag tatgtatgca tctattagac agctcaataa	4597
Gln Thr Arg Pro Gln Met	
1465	
gcactgttgt acgcttgttat gggtgggaca tatgggcggt atggcatgta tagttgtatg	4657
cctagatgta caacacgtgt actcgtatat atatatataa atgctgaaac aagcattgggt	4717
cctgtactgt agtttctaca tticattgtc accaataatt aagtgtactc ctatggctgg	4777
gagtctatga aaatggacgt gttgacttat tgggtaataa ataatttata taaaaaaaaa	4837
aaaaaaaaag	4846

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1469

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 17

Met Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Asn Ala Ala Ala Ala Glu Arg Cys
1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Arg Ala Arg Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ala Lys Arg
20 25 30

Gln Gln Gln Pro Gln Pro Ala Ser Leu Arg Arg Ser Gly Gly Gln Arg
35 40 45

Arg Pro Thr Thr Leu Ser Ala Ser Ser Arg Gly Pro Val Val Pro Arg  
 50 55 60

Ala Val Ala Thr Ser Ala Asp Arg Ala Ser Pro Asp Leu Ile Gly Lys  
 65 70 75 80

Phe Thr Leu Asp Ser Asn Ser Glu Leu Gln Val Ala Val Asn Pro Ala  
 85 90 95

Pro Gln Gly Leu Val Ser Glu Ile Ser Leu Glu Val Thr Asn Thr Ser  
 100 105 110

Gly Ser Leu Ile Leu His Trp Gly Ala Leu Arg Pro Asp Lys Arg Asp  
 115 120 125

Trp Ile Leu Pro Ser Arg Lys Pro Asp Gly Thr Thr Val Tyr Lys Asn  
 130 135 140

Arg Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser Gly Asp Asn Ser Thr Leu  
 145 150 155 160

Arg Ile Glu Ile Asp Asp Pro Gly Val His Ala Ile Glu Phe Leu Ile  
 165 170 175

Phe Asp Glu Thr Gln Asn Lys Trp Phe Lys Asn Asn Gly Gln Asn Phe  
 180 185 190

Gln Val Gln Phe Gln Ser Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Ala Ser Gly  
 195 200 205

Ala Ser Ser Ser Ala Thr Ser Thr Leu Val Pro Glu Asp Leu Val Gln  
 210 215 220

Ile Gln Ala Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Arg Gly Lys Gln Ser Tyr Thr  
 225 230 235 240

Pro Glu Gln Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Glu Leu Ile  
 245 250 255

Glu Glu Val Asn Arg Gly Val Ser Leu Glu Lys Leu Arg Ala Lys Leu  
 260 265 270

Thr Lys Ala Pro Glu Ala Pro Glu Ser Asp Glu Ser Lys Ser Ser Ala  
 275 280 285

Ser Arg Met Pro Ile Gly Lys Leu Pro Glu Asp Leu Val Gln Val Gln  
 290 295 300

Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Gln Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu  
 305 310 315 320

Gly Asn Ile Glu Ser Lys Val Ser Lys Gln Leu Lys Asn Lys Lys Tyr  
355 360 365

Leu Ser Lys His Lys His Thr Leu Val Glu Asp Lys Val Glu Val Val  
385 390 395 400

Lys Asp Gly Cys Glu Val Leu Ser Arg Lys Leu Phe Lys Phe Gly Asp  
420 425 430

His Leu Ala Thr Asn His Thr Asp Pro Leu Ile Leu His Trp Ser Leu  
450 455 460

Ser Gly Ser Thr Leu Leu Asp Lys Ala Cys Glu Thr Glu Phe Thr Lys  
485 490 495

Asp Gly Gly Tyr Lys Gly Met Pro Phe Val Leu Arg Ser Gly Glu Thr  
515 520 525

Asp Val Arg Asn Ile Lys Leu Lys Gly Asn Gly Asp Ala Gly Lys Gly  
545 550 555 560

Gln Arg Ser Leu Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ala Asp  
580 585 590



Gln Ala Arg Asp Ala Gly Leu Leu Gly Ile Val Gly Leu Phe Val Trp  
 595 600 605  
 Ile Arg Phe Met Ala Thr Arg Gln Leu Thr Trp Asn Lys Asn Tyr Asn  
 610 615 620  
 Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Phe Thr Asp Asp  
 625 630 635 640  
 Leu Glu Asn Met Tyr Lys Ala Tyr Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg  
 645 650 655  
 Met Ile Met Ala Ala Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln  
 660 665 670  
 Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys  
 675 680 685  
 Gly Gly Met Met Glu Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser  
 690 695 700  
 Pro Asp Asp Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser  
 705 710 715 720  
 Asp Phe Asp Ile Ser Val Tyr Trp Asp Thr Leu Asn Lys Asn Gly Ile  
 725 730 735  
 Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro  
 740 745 750  
 Asn Phe Arg Ser Glu Gln Lys Ala Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly Asn  
 755 760 765  
 Tyr Met Arg Ser Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser  
 770 775 780  
 Ala Ile Ala Ser Cys Met Gly Tyr Lys Ser Glu Gly Glu Gly Phe Met  
 785 790 795 800  
 Val Gly Val Gln Ile Asn Pro Val Lys Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro  
 805 810 815  
 Glu Leu Leu Glu Phe Val Leu Glu His Val Glu Asp Lys Ser Ala Glu  
 820 825 830  
 Pro Leu Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ala Arg Val Glu Leu Arg Pro Leu  
 835 840 845  
 Leu Leu Asp Ser Arg Glu Arg Met Lys Asp Leu Ile Phe Leu Asp Ile  
 850 855 860

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25  
 Ala Leu Asp Ser Thr Phe Arg Thr Ala Ile Glu Arg Ser Tyr Glu Glu  
 865 870 875 880

Leu Asn Asp Ala Ala Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val  
 885 890 895

Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser Ile Asp Asp Asn Glu Asp Ile Leu Tyr  
 900 905 910

Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln Ala Leu Glu Met Ala Lys Gln Lys Asp  
 915 920 925

Asp Gln Trp Ala Leu Tyr Ala Lys Ala Phe Leu Asp Arg Asn Arg Leu  
 930 935 940

Ala Leu Ala Ser Lys Gly Glu Gln Tyr His Asn Met Met Gln Pro Ser  
 945 950 955 960

Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Leu Leu Ser Ile Asp Gln Trp Ala Val Asn  
 965 970 975

Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gly Ser Ala Ala Thr Leu Ser  
 980 985 990

Ala Leu Leu Asn Arg Phe Asp Pro Val Leu Arg Asn Val Ala His Leu  
 995 1000 1005

Gly Ser Trp Gln Val Ile Ser Pro Val Glu Val Ser Gly Tyr Val  
 1010 1015 1020

Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ala Val Gln Asn Lys Ser Tyr Asp  
 1025 1030 1035

Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu  
 1040 1045 1050

Ile Pro Asp Gly Val Val Gly Val Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp  
 1055 1060 1065

Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn Ser Lys Val Leu  
 1070 1075 1080

Phe Ala Thr Cys Phe Asp His Thr Thr Leu Ser Glu Leu Glu Gly  
 1085 1090 1095

Tyr Asp Gln Lys Leu Phe Ser Phe Lys Pro Thr Ser Ala Asp Ile  
 1100 1105 1110

Thr Tyr Arg Glu Ile Thr Glu Ser Glu Leu Gln Gln Ser Ser Ser  
 1115 1120 1125

Pro Asn Ala Glu Val Gly His Ala Val Pro Ser Ile Ser Leu Ala  
 1130 1135 1140  
 Lys Lys Lys Phe Leu Gly Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Glu Glu Phe  
 1145 1150 1155  
 Ser Glu Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu  
 1160 1165 1170  
 Lys Gly Lys Val Pro Ser Trp Val Gly Val Pro Thr Ser Val Ala  
 1175 1180 1185  
 Ile Pro Phe Gly Thr Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Gly Leu Asn  
 1190 1195 1200  
 Lys Glu Val Ala Gln Ser Ile Glu Lys Leu Lys Ile Arg Leu Ala  
 1205 1210 1215  
 Gln Glu Asp Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Lys Val Val Leu  
 1220 1225 1230  
 Asn Leu Thr Ala Pro Met Gln Leu Val Asn Glu Leu Lys Glu Arg  
 1235 1240 1245  
 Met Leu Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Asp Lys  
 1250 1255 1260  
 Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser  
 1265 1270 1275  
 Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu  
 1280 1285 1290  
 Asp His Glu Tyr Leu Ser Met Ala Val Leu Val Gln Glu Val Val  
 1295 1300 1305  
 Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro Ser Ser  
 1310 1315 1320  
 Gly Asp Ser Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Lys Gly Leu Gly  
 1325 1330 1335  
 Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Met Ser Phe Val  
 1340 1345 1350  
 Cys Lys Lys Asp Asp Leu Asp Ser Pro Lys Leu Leu Gly Tyr Pro  
 1355 1360 1365  
 Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Arg Gln Ser Ile Ile Phe Arg  
 1370 1375 1380

BCS 04-5012\_Erhöhte Akt. OK1 & R1\_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ser	Asp	Ser	Asn	Gly	Glu	Asp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Ala	Gly	Ala	Gly
1385						1390					1395			
Leu	Tyr	Asp	Ser	Val	Pro	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Val	Val	Leu
1400						1405					1410			
Asp	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Leu	Ile	Val	Asp	Arg	Gly	Phe	Arg	Ser
1415						1420					1425			
Ser	Ile	Leu	Ser	Ser	Ile	Ala	Arg	Ala	Gly	His	Ala	Ile	Glu	Glu
1430						1435					1440			
Leu	Tyr	Gly	Ser	Pro	Gln	Asp	Val	Glu	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Gly
1445						1450					1455			
Lys	Ile	Tyr	Val	Val	Gln	Thr	Arg	Pro	Gln	Met				
1460						1465								

